

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-518539
(P2024-518539A)

(43)公表日 令和6年5月1日(2024.5.1)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全249頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-570121(P2023-570121)	(71)出願人	521533887		
(86)(22)出願日	令和4年5月4日(2022.5.4)		ジャナックス セラピューティクス、イ		
(85)翻訳文提出日	令和6年1月12日(2024.1.12)		ンク.		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/027688		アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォル		
(87)国際公開番号	WO2022/240637		ニア州 サンディエゴ ビスタ・ソレント		
(87)国際公開日	令和4年11月17日(2022.11.17)		・パークウェイ 1 0 9 5 5 スイート		
(31)優先権主張番号	63/187,690		2 0 0		
(32)優先日	令和3年5月12日(2021.5.12)	(74)代理人	110003797		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士法人清原国際特許事務所		
(31)優先権主張番号	63/327,317	(72)発明者	キャンベル, デイビッド		
(32)優先日	令和4年4月4日(2022.4.4)		アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォル		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ニア州 サンディエゴ ビスタ・ソレント		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(72)発明者	ディライモンド, トーマス アール.		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗体を標的とする腫瘍によって活性化される E G F R およびエフェクター細胞抗原に関する組成物および方法

(57)【要約】

本明細書には、上皮成長因子受容体 (E G F R) などの腫瘍関連抗原またはマーカーに対する抗体の1つの抗原相互作用部分 (a n t i g e n i n t e r a c t i n g p o r t i o n) の結合に依存し、その一方で第2の抗原相互作用部分が C D 3 などT細胞上のエフェクター細胞抗原、その医薬組成物、ならびに核酸に結合することができる、T細胞を癌にリダイレクト (r e d i r e c t) するための多重特異性抗体と、該多重特異性抗体を作製かつ発見するための方法とが、提供される。

【選択図】 図 1 B

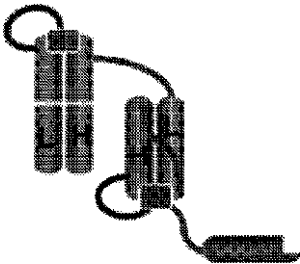


Fig. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の式 I に記載される単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、
【化 1】



(式 I)

10

式中、

A₁ は、エフェクター細胞抗原に結合する第 1 の抗原認識分子を含み、

P₁ は、前記 A₁ に結合するペプチドを含み、

L₁ は、前記 A₁ を前記 P₁ に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的プロテアーゼのための基質であり、

H₁ は、半減期延長分子を含み、および

A₂ は、上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合する第 2 の抗原認識分子を含む、
単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 2】

20

前記第 1 の抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3】

前記第 1 の抗原認識分子は、ヒト抗体またはヒト化抗体または抗体フラグメントを含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4】

前記 L₁ は、前記第 1 の抗原認識分子の N 末端に結合される、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 5】

前記 A₂ は、前記第 1 の抗原認識分子の C 末端に結合される、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

30

【請求項 6】

前記 L₁ は、前記第 1 の抗原認識分子の C 末端に結合される、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 7】

前記 A₂ は、前記第 1 の抗原認識分子の N 末端に結合される、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 8】

前記抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、または Fab フラグメントを含む、請求項 2 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

40

【請求項 9】

前記 A₁ は、前記単鎖可変フラグメント (scFv) である、請求項 8 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 10】

前記 scFv は、scFv 重鎖ポリペプチドおよび scFv 軽鎖ポリペプチドを含む、請求項 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 11】

前記 A₁ は、前記シングルドメイン抗体である、請求項 8 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

50

【請求項 12】

前記抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント（s c F v）、重鎖可変ドメイン（V Hドメイン）、軽鎖可変ドメイン（V Lドメイン）、またはラクダ科動物由来のシングルドメイン抗体の可変ドメイン（V H H）を含む、請求項 8 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 13】

前記 A₁ は、抗 C D 3 e 単鎖可変フラグメントを含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 14】

前記 A₁ は、C D 3 発現細胞上で C D 3 への 1 μ M 以下の K_D 結合を有する抗 C D 3 e 単鎖可変フラグメントを含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 15】

前記エフェクター細胞抗原は、C D 3 を含む、請求項 1 ～ 14 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 16】

前記 A₁ は、それぞれがヒト C D 3 に特異的に結合することができる可変軽鎖および可変重鎖を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 17】

前記 A₁ は、ムロモナブー C D 3（O K T 3）、オテリキシズマブ（T R X 4）、テブリズマブ（M G A 0 3 1）、ビジリズマブ（N u v i o n）、S P 3 4、X 3 5、V I T 3、B M A 0 3 0（B W 2 6 4 / 5 6）、C L B - T 3 / 3、C R I S 7、Y T H 1 2 . 5、F 1 1 1 - 4 0 9、C L B - T 3 . 4 . 2、T R - 6 6、W T 3 2、S P v - T 3 b、1 1 D 8、X I I I - 1 4 1、X I I I - 4 6、X I I I - 8 7、1 2 F 6、T 3 / R W 2 - 8 C 8、T 3 / R W 2 - 4 B 6、O K T 3 D、M - T 3 0 1、S M C 2、F 1 0 1 . 0 1、U C H T - 1、W T - 3 1、1 5 8 6 5、1 5 8 6 5 v 1 2、1 5 8 6 5 v 1 6、および 1 5 8 6 5 v 1 9 からなる群から選択される相補性決定領域（C D R s）を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 18】

前記式 I の前記単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、前記 L₁ が前記腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されるとき、エフェクター細胞に結合する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 19】

前記式 I の前記単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、前記 L₁ が前記腫瘍特異的プロテアーゼによって切断され、かつ前記 A₁ がエフェクター細胞に結合するとき、前記エフェクター細胞に結合する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 20】

前記エフェクター細胞は、T 細胞である、請求項 19 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 21】

前記 A₁ は、前記エフェクター細胞上の T C R - C D 3 複合体の一部であるポリペプチドに結合する、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 22】

前記 T C R - C D 3 複合体の一部である前記ポリペプチドは、ヒト C D 3 ε である、請求項 21 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 23】

前記エフェクター細胞抗原は C D 3 を含み、前記 s c F v は、C D R である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、前記 s c F v の前記 L C - C D R 1、前記 L C - C D R 2、および前記 L C - C D R 3 は、配列番号 1 の L C - C D R 1、

10

20

30

40

50

配列番号 2 の L C - C D R 2、および配列番号 3 の L C - C D R 3 を含み、かつ前記 s c F v は、相補性決定領域 (C D R) である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、前記 s c F v の前記 H C - C D R 1、前記 H C - C D R 2、および前記 H C - C D R 3 は、配列番号 4 の H C - C D R 1、配列番号 5 の H C - C D R 2、および配列番号 6 の H C - C D R 3 を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 2 4】

前記エフェクター細胞抗原は C D 3 を含み、かつ前記 A₁ は C D R である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、前記 A₁ の前記 L C - C D R 1、前記 L C - C D R 2、および前記 L C - C D R 3 は、配列番号 1 の L C - C D R 1、配列番号 2 の L C - C D R 2、および配列番号 3 の L C - C D R 3 を含み、かつ前記 A₁ は、相補性決定領域 (C D R) である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、前記 A₁ の前記 H C - C D R 1、前記 H C - C D R 2、および前記 H C - C D R 3 は、配列番号 4 の H C - C D R 1、配列番号 5 の H C - C D R 2、および配列番号 6 の H C - C D R 3 を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

10

【請求項 2 5】

前記エフェクター細胞抗原は C D 3 を含み、前記 s c F v は、配列番号 1 3 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

20

【請求項 2 6】

前記エフェクター細胞抗原は C D 3 を含み、前記 s c F v は、C D R である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、前記 s c F v の前記 L C - C D R 1、前記 L C - C D R 2、および前記 L C - C D R 3 は、配列番号 7 の L C - C D R 1、配列番号 8 の L C - C D R 2、および配列番号 9 の L C - C D R 3 を含み、かつ前記 s c F v は、相補性決定領域 (C D R) である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、前記 s c F v の前記 H C - C D R 1、前記 H C - C D R 2、および前記 H C - C D R 3 は、配列番号 1 0 の H C - C D R 1、配列番号 1 1 の H C - C D R 2、および配列番号 1 2 の H C - C D R 3 を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

30

【請求項 2 7】

前記エフェクター細胞抗原は C D 3 を含み、かつ前記 A₁ は C D R である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、前記 A₁ の前記 L C - C D R 1、前記 L C - C D R 2、および前記 L C - C D R 3 は、配列番号 7 の L C - C D R 1、配列番号 8 の L C - C D R 2、および配列番号 9 の L C - C D R 3 を含み、かつ前記 A₁ は、相補性決定領域 (C D R) である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、前記 A₁ の前記 H C - C D R 1、前記 H C - C D R 2、および前記 H C - C D R 3 は、配列番号 1 0 の H C - C D R 1、配列番号 1 1 の H C - C D R 2、および配列番号 1 2 の H C - C D R 3 を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

40

【請求項 2 8】

前記エフェクター細胞抗原は C D 3 を含み、前記 s c F v は配列番号 1 4 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 2 9】

前記第 2 の抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 0】

前記抗体またはその抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、または F a b を含む、請求項 2 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

50

ド複合体。

【請求項 3 1】

前記抗体またはその抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント（s c F v）、重鎖可変ドメイン（V Hドメイン）、軽鎖可変ドメイン（V Lドメイン）、またはラクダ科動物由来のシングルドメイン抗体の可変ドメイン（V H H）を含む、請求項 2 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 2】

前記抗体またはその抗体フラグメントは、ヒト化されているかヒトである、請求項 2 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 3】

前記 A₂ は F a b である、請求項 2 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 4】

前記 F a b は、（a）F a b 軽鎖ポリペプチドおよび（b）F a b 重鎖ポリペプチドを含む、請求項 3 3 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 5】

前記 F a b は、C D R である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、前記 F a b の前記 L C - C D R 1、前記 L C - C D R 2、および前記 L C - C D R 3 は、配列番号 1 5 の L C - C D R 1、配列番号 1 6 の L C - C D R 2、および配列番号 1 7 の L C - C D R 3 を含み、かつ前記 F a b は、相補性決定領域（C D R）である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、前記 F a b の前記 H C - C D R 1、前記 H C - C D R 2、および前記 H C - C D R 3 は、配列番号 1 8 の H C - C D R 1、配列番号 1 9 の H C - C D R 2、および配列番号 2 0 の H C - C D R 3 を含む、請求項 3 3 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 6】

前記 A₂ は、C D R である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、前記 A₂ の前記 L C - C D R 1、前記 L C - C D R 2、および前記 L C - C D R 3 は、配列番号 1 5 の L C - C D R 1、配列番号 1 6 の L C - C D R 2、および配列番号 1 7 の L C - C D R 3 を含み、かつ前記 A₂ は、相補性決定領域（C D R）である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、前記 A₂ の前記 H C - C D R 1、前記 H C - C D R 2、および前記 H C - C D R 3 は、配列番号 1 8 の H C - C D R 1、配列番号 1 9 の H C - C D R 2、および配列番号 2 0 の H C - C D R 3 を含む、請求項 3 3 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 7】

前記 F a b 軽鎖ポリペプチドは、配列番号 2 1 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 8】

前記 F a b 軽鎖ポリペプチドは、配列番号 2 2 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 3 9】

F a b 重鎖ポリペプチドは、配列番号 2 3 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4 0】

F a b 重鎖ポリペプチドは、配列番号 2 4 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4 1】

前記 A₂ の前記 F a b 軽鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の単鎖可変フラグメント（s c F v）の C 末端に結合される、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4 2】

10

20

30

40

50

前記 A₂ の前記 F a b 重鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の前記単鎖可変フラグメントの C 末端に結合される、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4 3】

前記 A₂ の前記 F a b 軽鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の前記単鎖可変フラグメントの N 末端に結合される、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4 4】

前記 A₂ の前記 F a b 重鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の前記単鎖可変フラグメントの N 末端に結合される、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

10

【請求項 4 5】

前記 A₂ の前記 F a b 重鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の s c F v 重鎖ポリペプチドに結合される、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4 6】

前記 A₂ の前記 F a b 軽鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の前記 s c F v 重鎖ポリペプチドに結合される、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4 7】

前記 A₂ の前記 F a b 重鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の前記 s c F v 軽鎖ポリペプチドに結合される、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

20

【請求項 4 8】

前記 A₂ の前記 F a b 軽鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の前記 s c F v 軽鎖ポリペプチドに結合される、請求項 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 4 9】

前記 A₂ は P₂ および L₂ をさらに含み、前記 P₂ は前記 A₂ に結合するペプチドを含み、ならびに、前記 L₂ は、前記 A₂ を前記 P₂ に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的プロテアーゼのための基質である、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 5 0】

以下の式 I a に記載される、請求項 4 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

30

【化 2】



(式 I a)

【請求項 5 1】

40

前記 A₂ の F a b 重鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の s c F v 重鎖ポリペプチドに結合しており、前記 L₂ は、前記 A₂ の F a b 軽鎖ポリペプチドに結合される、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 5 2】

前記 A₂ の F a b 軽鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の s c F v 重鎖ポリペプチドに結合しており、前記 L₂ は、前記 A₂ の F a b 重鎖ポリペプチドに結合される、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 5 3】

前記 A₂ の F a b 重鎖ポリペプチドは、前記 A₁ の前記 s c F v 軽鎖ポリペプチドに結合しており、前記 L₂ は、前記 A₂ の前記 F a b 軽鎖ポリペプチドに結合される、請求項

50

50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項54】

前記A₂の前記Fab軽鎖ポリペプチドは、前記A₁の前記scFv軽鎖ポリペプチドに結合しており、前記L₂は、前記A₂の前記Fab重鎖ポリペプチドに結合される、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項55】

前記P₁は、前記エフェクター細胞抗原への前記A₁の結合を損なわせる、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項56】

前記P₁は、イオン間相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、Pistacking相互作用、および水素結合相互作用、またはこれらの組合せによって、前記A₁に結合される、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。 10

【請求項57】

前記P₁は、前記エフェクター細胞抗原に対して70%未満の配列相同性を有する、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項58】

前記P₂は、EGFRへの前記A₂の結合を損なわせる、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項59】

前記P₂は、イオン間相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、Pistacking相互作用、および水素結合相互作用、またはこれらの組合せによって、前記A₂に結合される、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。 20

【請求項60】

前記P₂は、抗原結合部位で、またはその近くで前記A₂に結合される、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項61】

前記P₂は、EGFRに対して70%未満の配列相同性を有する、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項62】

前記P₁またはP₂は、少なくとも10アミノ酸長のペプチド配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。 30

【請求項63】

前記P₁またはP₂は、少なくとも10アミノ酸長かつ20アミノ酸長以下のペプチド配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項64】

前記P₁またはP₂は、少なくとも16アミノ酸長のペプチド配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項65】

前記P₁またはP₂は、40アミノ酸長以下のペプチド配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。 40

【請求項66】

前記P₁またはP₂は、少なくとも2つのシステインアミノ酸残基を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項67】

前記P₁またはP₂は、環状ペプチドまたは線状ペプチドを含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項68】

前記P₁またはP₂は、環状ペプチドを含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項69】

前記 P₁ または P₂ は、線状ペプチドを含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 70】

前記 P₁ は、少なくとも 2 つのシステインアミノ酸残基を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 71】

前記 P₁ は、配列番号 25 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 72】

前記 P₂ は、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

10

【請求項 73】

前記 P₁ は、配列番号 70 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 74】

前記 P₂ は、配列番号 26、71～96、98～776 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 26、71～96、98～776 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 75】

20

前記 P₂ は、X₁－C－X₂－X₃－X₄－X₅－D－X₆－A－X₇－P－X₈－C－X₉ に記載されるアミノ酸配列を含み、前記 X₁ は P および L から選択され、前記 X₂ は R、L、T、A、N、I、V、S、H、および P から選択され、前記 X₃ は S、P、F、および Y から選択され、前記 X₄ は H、L、Q、P、R、F、N から選択され、前記 X₅ は I、F、Y、H、N、T、S、D、A、L、および V から選択され、前記 X₆ は T、P、N、L、I、V、S、D、H、A、および Y から選択され、前記 X₇ は K および Y から選択され、前記 X₈ は I、P、L、および M から選択され、ならびに前記 X₉ は A、V、I、T、L、S、D、F、V、および H（配列番号 841）から選択される、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 76】

30

前記 X₁ は P および L から選択され、前記 X₂ は R、L、T、A、および N から選択され、前記 X₃ は S、P、および F から選択され、前記 X₄ は H、L、Q、および P から選択され、前記 X₅ は I、F、Y、H、N、および T から選択され、前記 X₆ は T、P、N、L、I、および V から選択され、前記 X₇ は K であり、前記 X₈ は I であり、ならびに前記 X₉ は A、V、I、T、L、および S から選択される、請求項 75 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 77】

前記 X₁ は P であり、前記 X₂ は R、L、および T から選択され、前記 X₃ は S であり、前記 X₄ は H、L、Q、および P から選択され、前記 X₅ は I、F、Y、および T から選択され、前記 X₆ は T、P、N、および V から選択され、前記 X₇ は K であり、ならびに前記 X₈ は I であり、ならびに前記 X₉ は A、V、および I から選択される、請求項 76 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

40

【請求項 78】

前記 P₂ は、配列番号 26、86～96 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 26、86～96 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 79】

前記 P₂ は、配列番号 26、86～96 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

50

【請求項 80】

前記 P₂ は、配列番号 98～776 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 98～776 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 81】

前記 P₂ は、配列番号 98～776 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 82】

前記 P₂ は、配列番号 99～118 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 99～118 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

10

【請求項 83】

前記 P₂ は、配列番号 99～118 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 84】

前記 P₂ は、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 26 に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

20

【請求項 85】

前記 P₂ は、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 86】

前記 P₁ は、配列番号 25、797～835、もしくは 843～1690 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 25、797～835、もしくは 843～1690 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 87】

30

前記 P₁ は、Z₁－Z₂－C－Z₄－P－Z₆－Z₇－Z₈－Z₉－Z₁₀－Z₁₁－Z₁₂－C－Z₁₄ に記載されるアミノ酸配列を含み、前記 Z₁ は D、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、および P から選択され、前記 Z₂ は D、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、および S から選択され、前記 Z₄ は G および W から選択され、前記 Z₆ は E、D、V、および P から選択され、前記 Z₇ は W、L、F、V、G、M、I、および Y から選択され、前記 Z₈ は E、D、P、および Q から選択され、前記 Z₉ は E、D、Y、V、F、W、P、L、および Q から選択され、前記 Z₁₀ は S、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、および H から選択され、前記 Z₁₁ は I、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、および H から選択され、前記 Z₁₂ は F、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、および H から選択され、ならびに前記 Z₁₄ は D、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、および S から選択される、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

40

【請求項 88】

前記 Z₁ は D、Y、F、I、および N から選択され、前記 Z₂ は D、Y、L、F、I、および N から選択され、前記 Z₄ は G および W から選択され、前記 Z₆ は E および D から選択され、前記 Z₇ は W、L、F、および V から選択され、前記 Z₈ は E および D から選択され、前記 Z₉ は E、D、Y、および V から選択され、前記 Z₁₀ は S、D、Y、T、および I から選択され、前記 Z₁₁ は I、Y、F、V、L、および T から選択され、前記 Z₁₂ は F、D、Y、L、I、V、A、および N から選択され、ならびに前記 Z₁₄ は D、Y、N、F、I、および P から選択される、請求項 87 に記載の単離されたポリペプチド

50

ドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 89】

前記 Z₁ は D、Y、および F から選択され、前記 Z₂ は D、Y、L、および F から選択され、前記 Z₄ は G および W から選択され、前記 Z₆ は E および D から選択され、前記 Z₇ は W、L、および F から選択され、前記 Z₈ は E および D から選択され、前記 Z₉ は E および D から選択され、前記 Z₁₀ は S、D、および Y から選択され、前記 Z₁₁ は I、Y、および F から選択され、前記 Z₁₂ は F、D、Y、および L から選択され、ならびに前記 Z₁₄ は D、Y、および N から選択される、請求項 88 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 90】

P₁ は U₁ - U₂ - C - U₄ - P - U₆ - U₇ - U₈ - U₉ - U₁₀ - U₁₁ - U₁₂ - C - U₁₄ に記載されるアミノ酸配列を含み、前記 U₁ は D、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、および P から選択され、前記 U₂ は D、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、および S から選択され、前記 U₄ は G および W から選択され、前記 U₆ は E、D、V、および P から選択され、前記 U₇ は W、L、F、V、G、M、I、および Y から選択され、前記 U₈ は E、D、P、および Q から選択され、前記 U₉ は E、D、Y、V、F、W、P、L、および Q から選択され、前記 U₁₀ は S、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、および H から選択され、前記 U₁₁ は I、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、および H から選択され、前記 U₁₂ は F、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、G、および H から選択され、ならびに前記 U₁₄ は D、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、M、および S から選択される、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 91】

前記 U₁ は D、Y、F、I、V、および N から選択され、前記 U₂ は D、Y、L、F、I、および N から選択され、前記 U₄ は G および W から選択され、前記 U₆ は E および D から選択され、前記 U₇ は W、L、F、G、および V から選択され、前記 U₈ は E および D から選択され、前記 U₉ は E、D、Y、および V から選択され、前記 U₁₀ は S、D、Y、T、および I から選択され、前記 U₁₁ は I、Y、F、V、L、および T から選択され、前記 U₁₂ は F、D、Y、L、I、V、A、G、および N から選択され、ならびに前記 U₁₄ は D、Y、N、F、I、M、および P から選択される、請求項 90 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 92】

前記 U₁ は D、Y、V、および F から選択され、前記 U₂ は D、Y、L、および F から選択され、前記 U₄ は G および W から選択され、前記 U₆ は E および D から選択され、前記 U₇ は W、L、G、および F から選択され、前記 U₈ は E および D から選択され、前記 U₉ は E および D から選択され、前記 U₁₀ は S、D、T、および Y から選択され、前記 U₁₁ は I、Y、V、L、および F から選択され、前記 U₁₂ は F、D、Y、G、A、および L から選択され、ならびに前記 U₁₄ は D、Y、M、および N から選択される、請求項 91 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 93】

P₁ は、配列番号 797～823 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 94】

P₁ は、配列番号 25、824～835、または 843～1690 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 95】

P₁ は、配列番号 824～835 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 96】

P₁は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号810のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項97】

P₁は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号811のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項98】

P₁は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号834のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項99】

P₁は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項100】

P₁は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項101】

P₁は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項102】

L₁は、A₁のN末端に結合される、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項103】

L₁は、A₁のC末端に結合される、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項104】

L₂は、A₂のN末端に結合される、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項105】

L₂は、A₂のC末端に結合される、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項106】

L₁またはL₂は、少なくとも5～50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項107】

L₁またはL₂は、少なくとも10～30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項108】

L₁またはL₂は、少なくとも10のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項109】

L₁またはL₂は、少なくとも18のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項110】

L₁またはL₂は、少なくとも26のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 1】

L₁ または L₂ は、(G₂S)_n を含む式を有し、式中、n は、1～3 の整数（配列番号 8 4 0）である、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 1 2】

L₁ は、(G₂S)_n、(GS)_n、(SGGS)_n（配列番号 8 3 6）、(GGGS)_n（配列番号 8 3 7）、(GGGGS)_n（配列番号 8 3 8）、および (SSSGS)_n（配列番号 8 3 9）からなる群から選択される式を有し、式中、n は、少なくとも 1 の整数である、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

10

【請求項 1 1 3】

P₁ は、L₁ が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A₁ から結合解除され、それによって前記 A₁ をエフェクター細胞抗原に晒す、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 1 4】

P₂ は、L₂ が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A₂ から結合解除され、それによって前記 A₂ を EGFR に晒す、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 1 5】

腫瘍特異的プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、およびアスパラギン酸プロテアーゼからなる群から選択される、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

20

【請求項 1 1 6】

前記マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP 2、MMP 7、MMP 9、MMP 13、または MMP 14 を含む、請求項 1 1 5 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 1 7】

前記セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ（MTP1）、ウロキナーゼ、またはヘブシンを含む、請求項 1 1 5 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

30

【請求項 1 1 8】

L₁ または L₂ は、ウロキナーゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリプターゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリックスメタロプロテアーゼで切断可能なアミノ酸配列、またはレグマインで切断可能なアミノ酸配列を含む、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 1 9】

L₁ または L₂ は、配列番号 3 0 または 3 1 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 0】

L₁ または L₂ は、配列番号 2 7～3 5 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

40

【請求項 1 2 1】

L₁ または L₂ は、リンカー 4（ISSGLLSGRSDAG）（配列番号 6 6）、リンカー 5（AAGLLAPPGGLSGRSDAG）（配列番号 6 7）、リンカー 6（SPLGLSGRSDAG）（配列番号 6 8）、もしくはリンカー 7（LSGRSDAGSPLGLAG）（配列番号 6 9）のアミノ酸配列、または、リンカー 4、リンカー 5、リンカー 6、もしくはリンカー 7 のアミノ酸配列に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

50

【請求項 1 2 2】

H₁は、ポリマーを含む、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 3】

前記ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である、請求項 1 2 2 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 4】

H₁は、アルブミンを含む、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 5】

H₁は、Fcドメインを含む、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 6】

前記アルブミンは、血清アルブミンである、請求項 1 2 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 7】

前記アルブミンは、ヒト血清アルブミンである、請求項 1 2 6 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 8】

H₁は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む、請求項 5 0 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 2 9】

前記ポリペプチド、前記リガンド、または前記小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、またはCD35／CR1に結合する、請求項 1 2 8 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 3 0】

前記血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスチレチン、1-酸性糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む、請求項 1 2 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 3 1】

循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM、またはIgDを含む、請求項 1 2 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 3 2】

前記血清タンパク質は、アルブミンである、請求項 1 2 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 3 3】

前記ポリペプチドは、抗体である、請求項 1 2 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 3 4】

前記抗体は、シングルドメイン抗体、単鎖可変フラグメント、またはFabを含む、請求項 1 3 3 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 3 5】

前記シングルドメイン抗体は、アルブミンに結合するシングルドメイン抗体を含む、請求項 1 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 3 6】

前記シングルドメイン抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 3 4 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 1 3 7】

10

20

30

40

50

前記シングルドメイン抗体は、645 g H 1 g L 1である、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項138】

前記シングルドメイン抗体は、645 d s g H 5 g L 4である、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項139】

前記シングルドメイン抗体は、23-13-A01-s c 02である、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項140】

前記シングルドメイン抗体は、A10m3またはそのフラグメントである、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項141】

前記シングルドメイン抗体は、DOM7r-31である、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項142】

前記シングルドメイン抗体は、DOM7h-11-15である、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項143】

前記シングルドメイン抗体は、Alb-1、Alb-8、またはAlb-23である、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項144】

前記シングルドメイン抗体は、10Eである、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項145】

前記シングルドメイン抗体は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、前記シングルドメイン抗体の前記HC-CDR1、前記HC-CDR2、および前記HC-CDR3は、配列番号36のHC-CDR1、配列番号37のHC-CDR2、および配列番号38のHC-CDR3を含む、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項146】

前記シングルドメイン抗体は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、前記シングルドメイン抗体の前記HC-CDR1、前記HC-CDR2、および前記HC-CDR3は、配列番号39のHC-CDR1、配列番号40のHC-CDR2、および配列番号41のHC-CDR3を含む、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項147】

前記シングルドメイン抗体は、SA21である、請求項134に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項148】

修飾されたアミノ酸、非天然アミノ酸、修飾された非天然アミノ酸、またはこれらの組合せを含む、請求項1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項149】

前記修飾されたアミノ酸または前記修飾された非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む、請求項148に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項150】

H₁は、前記H₁をP₁に接続する連結部分(L₃)を含む、請求項50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項151】

前記L₃は、少なくとも5～50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項150に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 152】

前記 L₃ は、少なくとも 10 ～ 30 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項 150 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 153】

前記 L₃ は、少なくとも 10 のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項 150 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 154】

前記 L₃ は、少なくとも 18 のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項 150 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 155】

前記 L₃ は、少なくとも 26 のアミノ酸を有するペプチド配列である、請求項 150 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 156】

前記 L₃ は、(G₂S)_n、(GS)_n、(SGGS)_n (配列番号 836)、(GGGS)_n (配列番号 837)、(GGGG)_n (配列番号 838)、および (SSGGGS)_n (配列番号 839) からなる群から選択される式を有し、式中、n は、少なくとも 1 の整数である、請求項 150 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 157】

前記 L₃ は、配列番号 29 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 150 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 158】

配列番号 44 ～ 61 のいずれか 1 つに対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 159】

配列番号 50 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 160】

配列番号 51 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 161】

配列番号 44 および配列番号 45 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 162】

配列番号 46 および配列番号 47 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 163】

配列番号 48 および配列番号 49 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 164】

配列番号 50 および配列番号 51 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 165】

配列番号 52 および配列番号 53 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 166】

配列番号 54 および配列番号 55 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 167】

10

20

30

40

50

配列番号 56 および配列番号 57 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 168】

配列番号 58 および配列番号 59 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 169】

配列番号 60 および配列番号 61 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 170】

配列番号 62 および配列番号 63 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 171】

配列番号 64 および配列番号 65 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 172】

(a) 請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体および (b) 薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 173】

請求項 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子。

【請求項 174】

P₂ は、配列番号 115 に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 115 に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 175】

P₂ は、配列番号 115 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 176】

P₂ は、配列番号 116 に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 116 に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【請求項 177】

P₂ は、配列番号 116 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 50 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(相互参照)

本出願は、2021 年 3 月 12 日出願の米国仮特許出願第 63 / 187, 690 号および 2022 年 4 月 4 日出願の米国仮特許出願第 63 / 327, 317 号の利益を主張するものであり、これらの出願はそれぞれ、その全体が参照によって本明細書に援用される。

【0002】

(配列表)

本出願は配列表を包含しており、これは、ASCII フォーマットで電子的に提出され、その全体を引用することで本明細書に組み込まれる。2022 年 4 月 29 日に作成された該 ASCII のコピーは、52426-738__601__SL. txt と名付けられ、そのサイズは 542, 564 バイトである。

【発明の概要】

【0003】

ある実施形態では、以下の式 I に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体で

10

20

30

40

50

あって、
 【 0 0 0 4 】
 【 化 1 】

$A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$

(式 I)

10

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的プロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子を含み、および A_2 は、上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合する第2の抗原認識分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、第1の抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、第1の抗原認識分子は、ヒト抗体またはヒト化抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、第1の抗原認識分子のN末端に結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 は、第1の抗原認識分子のC末端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_1 は、第1の抗原認識分子のC末端に結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 は、第1の抗原認識分子のN末端に結合される。いくつかの実施形態では、抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、またはFabフラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、単鎖可変フラグメント (scFv) である。いくつかの実施形態では、scFvは、scFv重鎖ポリペプチドおよびscFv軽鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、シングルドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント (scFv)、重鎖可変ドメイン (VHドメイン)、軽鎖可変ドメイン (VLドメイン)、またはラクダ科動物由来のシングルドメイン抗体の可変ドメイン (VHH) を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、抗CD3e単鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、CD3発現細胞上でCD3への $1\mu M$ 以下の K_D 結合を有する抗CD3e単鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原は、CD3を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、それぞれがヒトCD3に特異的に結合することができる可変軽鎖および可変重鎖を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、ムロモナブ-CD3 (OKT3)、オテリキシズマブ (TRX4)、テプリズマブ (MGA031)、ビジリズマブ (Nuvion)、SP34、X35、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16、および15865v19からなる群から選択される相補性決定領域 (CDR) を含む。いくつかの実施形態では、式Iの単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されるとエフェクター細胞に結合する。いくつかの実施形態では、式Iの単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断され、かつ A_1 がエフェクター細胞に結合するとエフェクター細胞に結合する。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、 A_1 は、エフェクター細胞上のTCR-CD3複合体の一部であるポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、TCR-CD3複合体の一部であるポリペプチド

20

30

40

50

は、ヒトCD3εである。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原はCD3を含み、scFvは、CDRであるLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3を含み、scFvのLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3において、LC-CDR1は配列番号1、LC-CDR2は配列番号2、およびLC-CDR3は配列番号3であり、かつscFvは、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、scFvのHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3において、HC-CDR1は配列番号4、HC-CDR2は配列番号5、およびHC-CDR3は配列番号6である。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原はCD3を含み、scFvは、配列番号13に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原はCD3を含み、scFvは、CDRであるLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3を含み、scFvのLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3は、配列番号7のLC-CDR1、配列番号8のLC-CDR2、および配列番号9のLC-CDR3を含み、かつscFvは、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、scFvのHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号10のHC-CDR1、配列番号11のHC-CDR2、および配列番号12のHC-CDR3を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原はCD3を含み、scFvは配列番号14に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、またはFabを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント(scFv)、重鎖可変ドメイン(VHドメイン)、軽鎖可変ドメイン(VLドメイン)、またはラクダ科動物由来のシングルドメイン抗体の可変ドメイン(VHH)を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、ヒト化されているかヒトである。いくつかの実施形態では、A₂はFabである。いくつかの実施形態では、Fabは、(a) Fab軽鎖ポリペプチドおよび(b) Fab重鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、Fabは、CDRであるLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3を含み、FabのLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3は、配列番号15のLC-CDR1、配列番号16のLC-CDR2、および配列番号17のLC-CDR3を含み、かつFabは、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、A₁のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号18のHC-CDR1、配列番号19のHC-CDR2、および配列番号20のHC-CDR3を含む。いくつかの実施形態では、Fab軽鎖ポリペプチドは、配列番号21に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Fab軽鎖ポリペプチドは、配列番号22に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Fab重鎖ポリペプチドは、配列番号23に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Fab重鎖ポリペプチドは、配列番号24に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₂のFab軽鎖ポリペプチドは、A₁の単鎖可変フラグメント(scFv)のC末端に結合される。いくつかの実施形態では、A₂のFab重鎖ポリペプチドは、A₁の単鎖可変フラグメントのC末端に結合される。いくつかの実施形態では、A₂のFab軽鎖ポリペプチドは、A₁の単鎖可変フラグメントのN末端に結合される。いくつかの実施形態では、A₂のFab重鎖ポリペプチドは、A₁の単鎖可変フラグメントのN末端に結合される。いくつかの実施形態では、A₂のFab重鎖ポリペプチドは、A₁のscFv重鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、A₂のFab軽鎖ポリペプチドは、A₁のscFv重鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、A₂のFab重鎖ポリペプチドは、A₁のscFv軽鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、A₂はP₂およびL₂をさらに含み、P₂はA₂に結合するペプチドを含み、ならびに、L₂は、A₂をP₂に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的

10

20

30

40

50

プロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、以下の式 I a に記載される。

【0005】

【化2】



(式 I a)

10

いくつかの実施形態では、 A_2 の Fab 重鎖ポリペプチドは、 A_1 の scFv 重鎖ポリペプチドに結合しており、 L_2 は、 A_2 の Fab 軽鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 の Fab 軽鎖ポリペプチドは、 A_1 の scFv 重鎖ポリペプチドに結合しており、 L_2 は、 A_2 の Fab 重鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 の Fab 重鎖ポリペプチドは、 A_1 の scFv 軽鎖ポリペプチドに結合しており、 L_2 は、 A_2 の Fab 軽鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 の Fab 軽鎖ポリペプチドは、 A_1 の scFv 軽鎖ポリペプチドに結合しており、 L_2 は、 A_2 の Fab 重鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原への A_1 の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、 P_1 は、イオン間相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π スタッキング相互作用、および水素結合相互作用、またはこれらの組合せによって、 A_1 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して 70% 未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFR への A_2 の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、 P_2 は、イオン間相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π スタッキング相互作用、および水素結合相互作用、またはこれらの組合せによって、 A_2 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、抗原結合部位で、またはその近くで A_2 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFR に対して 70% 未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 または P_2 は、少なくとも 10 アミノ酸長のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 または P_2 は、少なくとも 10 アミノ酸長かつ 20 アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 または P_2 は、少なくとも 16 アミノ酸長のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 または P_2 は、40 アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 または P_2 は、少なくとも 2 つのシステインアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 または P_2 は、環状ペプチドまたは線状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 または P_2 は、環状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 または P_2 は、線状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、少なくとも 2 つのシステインアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、配列番号 25 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、配列番号 115 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、配列番号 116 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、配列番号 70 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、 A_1 の N 末端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_1 は、 A_1 の C 末端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_2 は、 A_2 の N 末端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_2 は、 A_2 の C 末端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、少なくとも 5 ～ 50 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、少なくとも 10 ～ 30 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 または

20

30

40

50

L_2 は、少なくとも 10 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、少なくとも 18 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、少なくとも 26 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、 $(G_2S)_n$ を含む式を有し、式中、 n は、1~3 の整数（配列番号 840）である。いくつかの実施形態では、 L_1 は、 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ （配列番号 836）、 $(GGGS)_n$ （配列番号 837）、 $(GGGGS)_n$ （配列番号 838）、および $(GSSGGS)_n$ （配列番号 839）からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも 1 の整数である。いくつかの実施形態では、 P_1 は、 L_1 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A_1 から結合解除され、それによって A_1 をエフェクター細胞抗原に晒す。いくつかの実施形態では、 P_2 は、 L_2 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A_2 から結合解除され、それによって A_2 を EGFR に晒す。いくつかの実施形態では、腫瘍特異的プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、およびアスパラギン酸プロテアーゼからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、または MMP14 を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ（MTP1）、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、ウロキナーゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリプターゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリックスメタロプロテアーゼで切断可能なアミノ酸配列、またはレグマインで切断可能なアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、配列番号 30 または 31 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、配列番号 27~35 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、リンカー 4（ISSGLLSGRSDAG）（配列番号 66）、リンカー 5（AAGLLAPPGGLSGRSDAG）（配列番号 67）、リンカー 6（SPLGLSGRSDAG）（配列番号 68）、もしくはリンカー 7（LSGRSDAGSPLGLAG）（配列番号 69）のアミノ酸配列、または、リンカー 4、リンカー 5、リンカー 6、もしくはリンカー 7 のアミノ酸配列に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は、ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態では、 H_1 は、アルブミンを含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は、Fc ドメインを含む。いくつかの実施形態では、アルブミンは、血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、 H_1 は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド、リガンド、または小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、または CD35/CR1 を結合する。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスチレチン、1-酸性糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む。いくつかの実施形態では、循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM、または IgD を含む。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、アルブミンである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、シングルドメイン抗体、単鎖可変フラグメント、または Fab を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、アルブミンに結合するシングルドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、645gH1gL1 である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、645dsHgH5gL4 である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、23-13-A01-sc02 である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、A10m3 またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、シングルドメイン

10

20

30

40

50

抗体は、DOM7r-31である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、DOM7h-11-15である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、Alb-1、Alb-8、またはAlb-23である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、10Eである。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号36のHC-CDR1、配列番号37のHC-CDR2、および配列番号38のHC-CDR3を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号39のHC-CDR1、配列番号40のHC-CDR2、および配列番号41のHC-CDR3を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、SA21である。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、修飾されたアミノ酸、非天然アミノ酸、修飾された非天然アミノ酸、またはこれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたアミノ酸または修飾された非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、H₁は、H₁をP₁に接続する連結部分(L₃)を含む。いくつかの実施形態では、L₃は、少なくとも5~50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、L₃は、少なくとも10~30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、L₃は、少なくとも10のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、L₃は、少なくとも18のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、L₃は、少なくとも26のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、L₃は、(G₂S)_n、(GS)_n、(GSGGS)_n(配列番号836)、(GGGS)_n(配列番号837)、(GGGG)_n(配列番号838)、および(GSSGS)_n(配列番号839)からなる群から選択される式を有し、式中、nは、少なくとも1の整数である。いくつかの実施形態では、L₃は、配列番号29に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号44~61のいずれか1つに対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号50に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号51に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号44および配列番号45に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号46および配列番号47に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号48および配列番号49に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号50および配列番号51に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号52および配列番号53に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号54および配列番号55に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号56および配列番号57に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号58および配列番号59に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号6

10

20

30

40

50

0 および配列番号 6 1 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 6 2 および配列番号 6 3 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 6 4 および配列番号 6 5 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0006】

ある実施形態では、(a) 本明細書に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体および (b) 薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物が本明細書に記載される。

10

【0007】

ある実施形態では、本明細書に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子が本明細書に記載される。

【0008】

ある実施形態では、以下の式 I I に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0009】

【化 3】

式 I I : $L_{1a}-P_{1a}-H_{1a}$

20

(式 I I)

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第 1 の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分を含み、かつ第 1 の抗原認識分子は、E G F R に結合する第 2 の抗原認識分子に結合しており、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第 1 の抗原認識分子に結合するペプチドを含み、および、 H_{1a} は、半減期延長分子を含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のときエフェクター細胞抗原への第 1 の抗原認識分子の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、第 1 の抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原は、抗 C D 3 エフェクター細胞抗原である。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、エフェクター細胞抗原に対して 7 0 % 未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、少なくとも 1 0 アミノ酸長のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、少なくとも 1 0 アミノ酸長かつ 2 0 アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、少なくとも 1 6 アミノ酸長のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、4 0 アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、少なくとも 2 つのシステインアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、環状ペプチドまたは線状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、環状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、線状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号 2 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号 7 0 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 H_{1a} は、ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール (P E G) である。いくつかの実施形態では、 H_{1a} は、アルブミンを含む。いくつかの実施形態では、 H_{1a} は、F c ドメインを含む。いくつかの実施形態では、アルブミンは、血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。いく

30

40

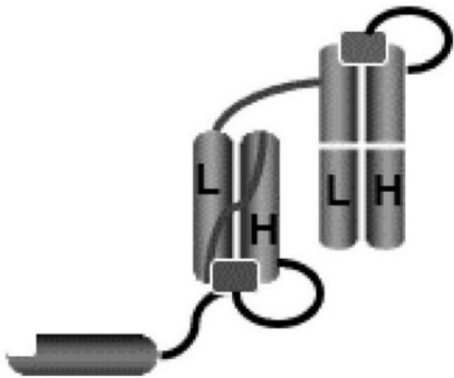
50

つかの実施形態では、 H_{1a} は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド、リガンド、または小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、またはCD35/CR1を結合する。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスチレチン、1-酸性糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む。いくつかの実施形態では、循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、slgA、IgM、またはIgDを含む。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、アルブミンである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、シングルドメイン抗体、単鎖可変フラグメント、またはFabを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、アルブミンに結合するシングルドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、645gH1gL1である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、645ds gH5gL4である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、23-13-A01-sc02である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、A10m3またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、DOM7r-31である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、DOM7h-11-15である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、Alb-1、Alb-8、またはAlb-23である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、10Gである。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号36のHC-CDR1、配列番号37のHC-CDR2、および配列番号38のHC-CDR3を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号39のHC-CDR1、配列番号40のHC-CDR2、および配列番号41のHC-CDR3を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、SA21である。いくつかの実施形態では、 H_{1a} は、 H_{1a} を P_{1a} に接続する連結部分(L_{1a})を含む。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも5~50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも10~30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも10のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも18のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも26のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (配列番号836)、 $(GGGS)_n$ (配列番号837)、 $(GGGG)_n$ (配列番号838)、および $(GSSGGS)_n$ (配列番号839)からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも1の整数である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、配列番号30または31に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、配列番号27~35のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、リンカー4(IS SGLLSGRSDAG)(配列番号66)、リンカー5(AAGLLAPPGGLSGRSDAG)(配列番号67)、リンカー6(SPLGLSGRSDAG)(配列番号68)、もしくはリンカー7(LSGRSDAGSPLGLAG)(配列番号69)のアミノ酸配列、または、リンカー4、リンカー5、リンカー6、もしくはリンカー7のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

[0010]

ある実施形態では、以下の構成1に記載される構造配置を含むポリペプチド複合体であ

って、
【 0 0 1 1 】
【 化 4 】



10

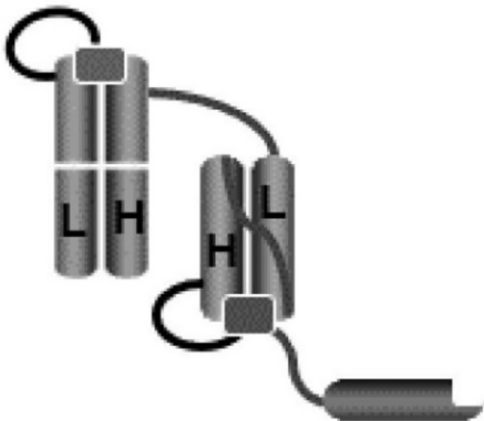
構成 1

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（s c F v）を含み、s c F vは、エフェクター細胞抗原へのs c F vの結合を損なわせるペプチド（P₁）に連結しており、かつP₁は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分（L₁）によって、s c F vの重鎖可変ドメインのN末端に連結しており、かつP₁は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体（EGFR）に結合するF a bとにさらに連結しており、F a bは、F a b軽鎖ポリペプチドおよびF a b重鎖ポリペプチドを含み、F a b軽鎖ポリペプチドは、s c F vの軽鎖可変ドメインのC末端に連結しており、および、F a bは、P₂およびL₂に連結しており、P₂は、EGFRへの結合を損なわせるペプチドを含み、かつL₂は、F a b重鎖ポリペプチドをP₂に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、ポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

20

30

【 0 0 1 2 】
ある実施形態では、以下の構成 2 に記載される構造配置を含むポリペプチド複合体であって、
【 0 0 1 3 】
【 化 5 】



40

構成 2

50

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（s c F v）を含み、s c F vは、エフェクター細胞抗原へのs c F vの結合を損なわせるペプチド（P₁）に連結しており、かつP₁は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分（L₁）によって、s c F vの重鎖可変ドメインのN末端に連結しており、かつP₁は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体（E G F R）に結合するF a bとにさらに連結しており、F a bは、F a b軽鎖ポリペプチドおよびF a b重鎖ポリペプチドを含み、F a b重鎖ポリペプチドは、s c F vの軽鎖可変ドメインのC末端に連結しており、および、F a bは、P₂およびL₂に連結しており、P₂は、E G F Rへの結合を損なわせるペプチドを含み、かつL₂は、F a b軽鎖ポリペプチドをP₂に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、ポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

10

【0014】

（参照による援用）

本明細書で言及されるすべての公報、特許、および特許出願は、個々の公報、特許、または特許出願が引用によって組み込まれるように具体的かつ個別に示されるのと同じ程度まで、引用によって本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

本開示の新規な特徴は、とりわけ添付の特許請求の範囲に記載される。本開示の特徴と利点についてのよりよい理解は、本開示の原則が用いられている例証的な実施形態と添付の図面を説明する以下の詳細な記載とを参照することによって得られる。

20

【図1A】図1A～1Bは、本開示のポリペプチド複合体を図示する。

【図1B】図1A～1Bは、本開示のポリペプチド複合体を図示する。

【図2】図2は、E L I S Aによって測定された本開示のいくつかのポリペプチド複合体のE G F Rへの結合を図示する。

【図3】図3は、E L I S Aによって測定された本開示のいくつかのポリペプチド複合体のC D 3への結合を図示する。

【図4】図4は、本開示のポリペプチド複合体がC D 8 + T細胞の存在下でH C T 1 1 6腫瘍細胞死滅を媒介したことを図示する。

【図5】図5は、本開示のポリペプチド複合体がC D 8 + T細胞の存在下でA 4 3 1腫瘍細胞死滅を媒介したことを図示する。

30

【図6】図6は、本開示のポリペプチド複合体のヒトおよびカニクイザルのE G F Rに対する動態結合（k i n e t i c b i n d i n g）および交差反応性を図示する。

【図7】図7は、本開示のポリペプチド複合体のヒトおよびカニクイザルのE G F Rに対する平衡結合および交差反応性を図示する。

【図8】図8は、いくつかのポリペプチド複合体のヒトおよびカニクイザルのC D 3 εに対する動態結合および交差反応性を図示する。

【図9】図9は、本開示のポリペプチド複合体のヒトおよびカニクイザルのC D 3 εに対する平衡結合および交差反応性を図示する。

【図10A】図10A～10Bは、本開示のポリペプチド複合体の単回のI V ボーラス注射後のカニクイザルにおける薬物動態を図示する。

40

【図10B】図10A～10Bは、本開示のポリペプチド複合体の単回I V ボーラス注射後のカニクイザルにおける薬物動態を図示する。

【図11A】図11A～11Lは、本開示のポリペプチド複合体の単回I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図11B】図11A～11Lは、本開示のポリペプチド複合体の単回I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図11C】図11A～11Lは、本開示のポリペプチド複合体の単回I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図11D】図11A～11Lは、本開示のポリペプチド複合体の単回I V ボーラス後の

50

カニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 1 E】図 1 1 A～1 1 L は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 1 F】図 1 1 A～1 1 L は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 1 G】図 1 1 A～1 1 L は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 1 H】図 1 1 A～1 1 L は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 1 I】図 1 1 A～1 1 L は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 1 J】図 1 1 A～1 1 L は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 1 K】図 1 1 A～1 1 L は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 1 L】図 1 1 A～1 1 L は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおけるサイトカイン放出を図示する。

【図 1 2】図 1 2 は、炎症性サイトカイン濃度における本開示のポリペプチド複合体の投与を図示する。

【図 1 3 A】図 1 3 A～1 3 D は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおける血清肝酵素を図示する。

【図 1 3 B】図 1 3 A～1 3 D は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおける血清肝酵素を図示する。

【図 1 3 C】図 1 3 A～1 3 D は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおける血清肝酵素を図示する。

【図 1 3 D】図 1 3 A～1 3 D は、本開示のポリペプチド複合体の単回 I V ボーラス後のカニクイザルにおける血清肝酵素を図示する。

【図 1 4】図 1 4 は、E L I S A によって測定された本開示のペプチドによる α E G F R I g G の結合の結合曲線を図示する。

【図 1 5】図 1 5 は、E L I S A によって測定された本開示のペプチドによる E G F R 抗原への α E G F R I g G 結合の阻害を図示する。

【図 1 6】図 1 6 は、E L I S A によって測定された本開示のペプチドによる α E G F R F a b の結合の結合曲線を図示する。

【図 1 7】図 1 7 は、E L I S A によって測定された本開示のペプチドによる E G F R 抗原への α E G F R F a b 結合の阻害を図示する。

【図 1 8】図 1 8 は、E L I S A によって測定されたペプチドー 8 のアラニンキャンニングペプチド (a l a n i n e s c a n n i n g p e p t i d e s) による E G F R 抗原への α E G F R F a b 結合の阻害を図示する。

【図 1 9】図 1 9 は、E L I S A によって測定されたペプチドー 8 のアラニンキャンニングペプチドによる E G F R 抗原への α E G F R F a b 結合の阻害を図示する。

【図 2 0】図 2 0 は、Web L o g o 3 . 7 . 4 を用いて生成された最適化された α E G F R F a b ペプチドー 8 のコンセンサス配列を図示する。

【図 2 1】図 2 1 は、ファージディスプレイによって同定されるペプチドによる α E G F R F a b 結合を図示する。

【図 2 2】図 2 2 は、ファージディスプレイによって同定されるペプチドによる α E G F R F a b 結合を図示する。

【図 2 3】図 2 3 は、ファージディスプレイによって同定されるペプチドによる E G F R への α E G F R F a b 結合の阻害を図示する。

【図 2 4】図 2 4 は、ファージディスプレイによって同定されるペプチドによる E G F R への α E G F R F a b 結合の阻害を図示する。

10

20

30

40

50

【図 25】図 25 は、HCT116 異種移植片腫瘍に対して耐性を有するヒト PBMC 生着 NCG マウスにおける異なる量の PC1 を用いたインビボでの腫瘍増殖阻害を図示する。

【図 26】図 26 は、HCT116 異種移植片腫瘍に対して耐性を有するヒト PBMC 生着 NCG マウスにおける異なる量の PC5 を用いたインビボでの腫瘍増殖阻害を図示する。

【図 27】図 27 は、HCT116 異種移植片腫瘍に対して耐性を有するヒト PBMC 生着 NCG マウスにおける異なる量の PC7 を用いたインビボでの腫瘍増殖阻害を図示する。

【図 28】図 28 は、HCT116 異種移植片腫瘍に対して耐性を有するヒト PBMC 生着 NCG マウスにおける異なる量の PC6 を用いたインビボでの腫瘍増殖阻害を図示する。

【図 29】図 29 は、ELISA によって測定されたヒト CD3ε への PC1 および PC4 結合を示す。

【図 30】図 30 は、ELISA によって測定されたカニクイザル CD3ε への PC1 および PC4 結合を示す。指示があれば、PC4 を、プロテアーゼを用いて処置した。

【図 31】図 31 は、ELISA によって測定されたヒト EGFR への PC1 および PC4 結合を示す。指示があれば、PC4 を、プロテアーゼを用いて処置した。

【図 32】図 32 は、ELISA によって測定されたカニクイザル EGFR への PC1 および PC4 結合を示す。指示があれば、PC4 を、プロテアーゼを用いて処置した。

【図 33】図 33 は、ELISA によって測定されたヒトアルブミンへの PC4 結合を示す。

【図 34】図 34 は、ELISA によって測定されたカニクイザルアルブミンへの PC4 結合を示す。

【図 35】図 35 は、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の存在下で PC1 および PC4 が A549 細胞の死滅を媒介したことを示す。指示があれば、PC4 を、プロテアーゼを用いて処置した。

【図 36】図 36 は、PC4 および PC1 の濃度が上昇している EGFR 陽性 HCT116 腫瘍細胞における IFNγ サイトカイン濃度を示す。指示があれば、PC4 を、プロテアーゼを用いて処置した。

【図 37】図 37 は、PC4 および PC1 の濃度が上昇している EGFR 陽性 HCT116 腫瘍細胞における TNF サイトカイン濃度を示す。指示があれば、PC4 を、プロテアーゼを用いて処置した。

【図 38】図 38 は、PC4 および PC1 の濃度が上昇している EGFR 陽性 A549 腫瘍細胞における IFNγ サイトカイン濃度を示す。指示があれば、PC4 を、プロテアーゼを用いて処置した。

【図 39】図 39 は、PC4 および PC1 の濃度が上昇している EGFR 陽性 A549 腫瘍細胞における TNF サイトカイン濃度を示す。指示があれば、PC4 を、プロテアーゼを用いて処置した。

【図 40】図 40 は、本開示の HCT116 マウス腫瘍モデル研究の概略図を示す。

【図 41】図 41 は、HCT116 腫瘍細胞を移植した PBMC 生着マウスにおける PC1、PC7、および PC6 を用いた処置の日数に対する平均腫瘍容積を示す。

【図 42】図 42 は、HCT116 腫瘍細胞を移植した PBMC 生着マウスにおける PC5 およびビヒクルを用いた処置の日数に対する平均腫瘍容積を示す。

【図 43】図 43 は、PC1、PC5、および PC6 を用いて処置した場合の HCT116 腫瘍細胞を移植した PBMC 生着マウスにおける生存率を示す。

【図 44】図 44 は、本開示のヒト大腸癌 (CRC) オルガノイド研究の概略図を示す。

【図 45】図 45 は、ヒト大腸癌腫瘍オルガノイド (tumoroid) における PC1 および PC5 を用いた活性マーカー CD25、CD69、4-1BB、およびグランザイムの導入を示す。

10

20

30

40

50

【図４６】図４６は、カニクイザルにおけるＰＣ１の最大耐量（ＭＴＤ）およびＰＣ４の無毒性量を示す。

【図４７】図４７は、ＩＶボラス注射後の異なる投与量のＰＣ４を用いた場合のカニクイザルにおける薬物動態を示す。

【図４８】図４８は、ＥＬＩＳＡによって測定されたＥＧＦＲへのＰＣ１０およびＰＣ１１結合を示す。

【図４９】図４９は、ＥＬＩＳＡによって測定されたＣＤ３へのＰＣ１０およびＰＣ１１結合を示す。

【図５０】図５０は、ＣＤ８＋Ｔ細胞の存在下におけるＰＣ１０およびＰＣ１１によって媒介されたＨＣＴ１１６腫瘍細胞の死滅のグラフを示す。

10

【図５１Ａ】図５１Ａ～５１Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－Ｂのアラニンスキャンニングペプチドによる抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合を図示する。

【図５１Ｂ】図５１Ａ～５１Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－Ｂのアラニンスキャンニングペプチドによる抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合を図示する。

【図５１Ｃ】図５１Ａ～５１Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－Ｂのアラニンスキャンニングペプチドによる抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合を図示する。

【図５１Ｄ】図５１Ａ～５１Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－Ｂのアラニンスキャンニングペプチドによる抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合を図示する。

20

【図５１Ｅ】図５１Ａ～５１Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－Ｂのアラニンスキャンニングペプチドによる抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合を図示する。

【図５１Ｆ】図５１Ａ～５１Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－Ｂのアラニンスキャンニングペプチドによる抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合を図示する。

【図５２Ａ】図５２Ａ～５２Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－ＢのアラニンスキャンニングペプチドによるＣＤ３への抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合の阻害を図示する。

30

【図５２Ｂ】図５２Ａ～５２Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－ＢのアラニンスキャンニングペプチドによるＣＤ３への抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合の阻害を図示する。

【図５２Ｃ】図５２Ａ～５２Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－ＢのアラニンスキャンニングペプチドによるＣＤ３への抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合の阻害を図示する。

【図５２Ｄ】図５２Ａ～５２Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－ＢのアラニンスキャンニングペプチドによるＣＤ３への抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合の阻害を図示する。

40

【図５２Ｅ】図５２Ａ～５２Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－ＢのアラニンスキャンニングペプチドによるＣＤ３への抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合の阻害を図示する。

【図５２Ｆ】図５２Ａ～５２Ｆは、ＥＬＩＳＡによって測定された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ａおよびペプチド－ＢのアラニンスキャンニングペプチドによるＣＤ３への抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合の阻害を図示する。

【図５３Ａ】図５３Ａ～５３Ｂは、ＥＬＩＳＡによって測定された最適化された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ｂ配列による抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合を図示する。

【図５３Ｂ】図５３Ａ～５３Ｂは、ＥＬＩＳＡによって測定された最適化された抗ＣＤ３　ｓｃＦｖペプチド－Ｂ配列による抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ結合を図示する。

50

【図54A】図54A～54Bは、ELISAによって測定された最適化された抗CD3 s c F v ペプチド-B配列によるCD3への抗CD3 s c F v 結合の阻害を図示する。

【図54B】図54A～54Bは、ELISAによって測定された最適化された抗CD3 s c F v ペプチド-B配列によるCD3への抗CD3 s c F v 結合の阻害を図示する。

【図55】図55は、Web Logo 3.7.4を用いた最適化された抗CD3 s c F v ペプチド-B配列のコア配列モチーフを図示する。

【0016】

(発明の詳細な説明)

多重特異性抗体は、2つ以上の抗体に由来する異なる結合特異性の利点を組み合わせて単一の組成物にする。T細胞を癌にリダイレクト (redirect) するための多重特異性抗体は、前臨床研究および臨床研究の両方において有望であることが示されている。このアプローチは、腫瘍関連抗原またはマーカーへの抗体の1つの抗原相互作用部分 (antigen interacting portion) の結合に依存するが、第2の抗原相互作用部分は、CD3などのT細胞上のエフェクター細胞抗原に結合することができ、次いで、これが細胞傷害活性を誘発する。このような腫瘍関連抗原の1つは、上皮成長因子受容体 (EGFR) である。EGFRは、細胞外タンパク質リガンドの上皮成長因子ファミリーのメンバーの受容体である膜貫通タンパク質である。EGFRは、癌において最も一般的に過剰発現される膜タンパク質である。しかし、EGFR発現は腫瘍に限定されず、身体全体で広く発現され、EGFR指向療法による全身毒性をもたらす。

【0017】

T細胞エンゲージャー (TCE) 療法は、細胞療法ではないことを含むいくつかの利点を有し、したがって、キメラ抗原受容体T細胞 (CAR T細胞) 療法とは対照的に、既製の療法として提供することができる。TCE療法は血液癌において強力な抗腫瘍活性を示したが、固形腫瘍を治療するためのTCEの開発は、従来のTCE技術の制限、すなわち、(i) サイトカイン放出症候群 (CRS) をもたらす免疫系の過剰活性化、(ii) オンターゲットの健康な組織毒性、および (iii) 短い半減期をもたらす乏しい薬物動態 (PK) に起因する課題に直面している。CRSは、T細胞の全身活性化から生じ、インターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカインの生命を脅かす上昇をもたらし得る。用量制限毒性および死亡をもたらす重度および急性のCRSは、不良な臨床研究において癌患者を処置するための他のプラットフォームを使用して開発されたT細胞エンゲージャーの投与時に観察されている。この毒性は、安全に投与され得るT細胞エンゲージャーの最大血中濃度を制限する。T細胞エンゲージャーの有効性はまた、オンターゲットの健康な組織毒性のために制限されている。腫瘍特異的活性化のために設計されていないプラットフォームを使用して開発されたT細胞エンゲージャーは、健康な組織における標的発現から生じる臨床的ホールドおよび用量制限毒性をもたらした。T細胞エンゲージャーはまた、短い半減期によって制限されている。T細胞エンゲージャーは、それらの短い曝露半減期のために身体から迅速に除去されるので、投与された後、治療レベル未満に迅速に到達する。この理由で、プリナツモマブなどのT細胞エンゲージャーは、典型的には、短い半減期の課題を克服し、体内の薬物の治療レベルを維持するために、数週間にわたって低用量の連続注入ポンプによって投与される。連続投与レジメンは、患者にとって重大な負担となる。

【0018】

T細胞エンゲージャーの有効性に関連するこれらの課題を克服するために、エフェクター細胞抗原およびEGFRに選択的に結合する結合ドメインを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、1つ以上の結合ドメインが腫瘍微小環境において選択的に活性化され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体が半減期延長分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。そのような修飾は、CRSおよびオンターゲット健康組織毒性リスクを低減し、活性化前の血流中の安定性および血清半減期を改善する。本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、低レベルの標的発現で活性を有し、容易に製造される。

10

20

30

40

50

【0019】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、癌を処置する方法において使用される。いくつかの実施形態では、癌は、EGFRを発現する細胞を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、大腸癌（CRC）、頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）、非小細胞肺癌（NSCLC）、前立腺癌、乳癌、大腸癌、頭頸部癌、食道胃癌、肝臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、腎臓癌、または膵臓癌を処置する方法において使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、EGFR阻害薬治療に対して耐性を示す対象を処置する方法において使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、KRAS突然変異を有する対象を処置する方法において使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、EGFR阻害薬治療に対して耐性を示し、かつKRAS突然変異を有する対象を処置する方法において使用される。いくつかの実施形態は、以下の式Iに記載される単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、癌を処置する方法であって、

10

【0020】

【化6】



20

(式I)

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子を含み、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子を含む、方法、である。

30

【0021】

いくつかの実施形態では、以下の式Iに記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0022】

【化7】



40

(式I)

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子を含み、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子を含む、ポリペ

50

チドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

【0023】

いくつかの実施形態では、以下のⅠに記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0024】

【化8】



10

(式Ⅰ)

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子であり、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドであり、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分であり、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子であり、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

20

【0025】

いくつかの実施形態では、以下の式Ⅰを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0026】

【化9】



30

(式Ⅰ)

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子を含み、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

40

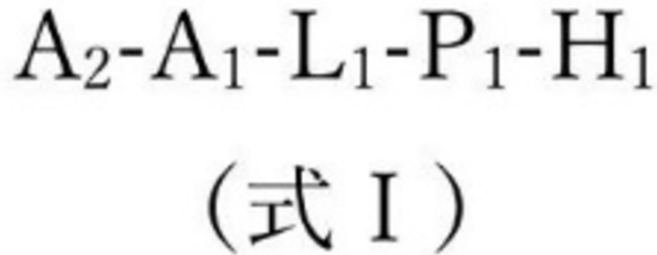
【0027】

いくつかの実施形態では、以下の式Ⅰを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0028】

50

【化 1 0】



10

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子であり、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドであり、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分であり、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子であり、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

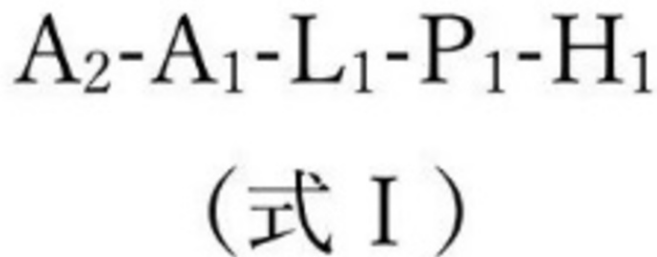
【0029】

いくつかの実施形態では、以下の式 I に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0030】

【化 1 1】

20



30

式中、 A_1 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第1の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に結合する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子を含み、 A_2 は、エフェクター細胞抗原に結合する第2の抗原認識分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

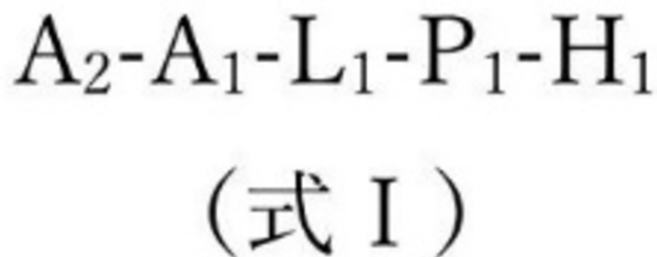
【0031】

いくつかの実施形態では、以下の式 I に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0032】

【化 1 2】

40



式中、 A_1 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第1の抗原認識分子であり、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドであり、 L_1 は、 A_1 を P_1 に結合する連結部分であり

50

、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子であり、 A_2 は、エフェクター細胞抗原に結合する第2の抗原認識分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

【0033】

いくつかの実施形態では、以下の式Iを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0034】

【化13】



10

(式I)

式中、 A_1 は、上皮成長因子受容体(EGFR)に結合する第1の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に結合する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子を含み、 A_2 は、エフェクター細胞抗原に結合する第2の抗原認識分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、以下の式Iを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0036】

【化14】



30

(式I)

式中、 A_1 は、上皮成長因子受容体(EGFR)に結合する第1の抗原認識分子であり、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドであり、 L_1 は、 A_1 を P_1 に結合する連結部分であり、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子であり、 A_2 は、エフェクター細胞抗原に結合する第2の抗原認識分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

40

【0037】

いくつかの実施形態では、式Iaに記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0038】

50

【化 1 5】



(式 Ia)

10

式中、 A_2 は、 P_2 および L_2 をさらに含み、 P_2 は、 A_2 に結合するペプチドを含み、および、 L_2 は、 A_2 を P_2 に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

【0039】

いくつかの実施形態では、式 Ia に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0040】

【化 1 6】

20



(式 Ia)

式中、 A_2 は、 P_2 および L_2 をさらに含み、 P_2 は、 A_2 に結合するペプチドであり、および、 L_2 は、 A_2 を P_2 に接続する連結部分であり、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

30

【0041】

いくつかの実施形態では、式 Ia を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0042】

【化 1 7】

40



(式 Ia)

式中、 A_2 は、 P_2 および L_2 をさらに含み、 P_2 は、 A_2 に結合するペプチドを含み、および、 L_2 は、 A_2 を P_2 に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

50

【0043】

いくつかの実施形態では、式 Ia を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0044】

【化18】



10

(式 Ia)

式中、 A_2 は、 P_2 および L_2 をさらに含み、 P_2 は、 A_2 に結合するペプチドであり、および、 L_2 は、 A_2 を P_2 に接続する連結部分であり、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

【0045】

いくつかの実施形態では、式 II に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

20

【0046】

【化19】



(式 II)

30

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断された連結部分を含み、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合する第2の抗原認識分子に結合しており、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドを含み、および、 H_{1a} は、半減期延長分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

【0047】

いくつかの実施形態では、式 II を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

40

【0048】

50

【化 2 0】



(式 I I)

10

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分を含み、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合しており、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドを含み、および、 H_{1a} は、半減期延長分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

【0049】

いくつかの実施形態では、式 I I に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0050】

20

【化 2 1】



(式 I I)

30

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分であり、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合しており、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドであり、および、 H_{1a} は、半減期延長分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

【0051】

いくつかの実施形態では、式 I I を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0052】

40

【化 2 2】



(式 I I)

50

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分であり、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合しており、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドであり、および、 H_{1a} は、半減期延長分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、が本明細書に記載される。

【0053】

いくつかの実施形態では、第1の抗原認識分子がエフェクター細胞抗原に結合し、第2の抗原認識分子がEGFRに結合する、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原は、CD3を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含む。

【0054】

いくつかの実施形態では、 A_1 は、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、ヒト抗体またはヒト化抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、抗体または抗体フラグメントのN末端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_1 は抗体または抗体フラグメントのN末端に結合し、 A_2 は抗体または抗体フラグメントの他のN末端に結合する。いくつかの実施形態では、 A_2 は、抗体または抗体フラグメントのC末端に結合する。いくつかの実施形態では、 L_1 は、抗体または抗体フラグメントのC末端に結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 は、抗体または抗体フラグメントのN末端に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、単ドメイン抗体、またはFabフラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は単鎖可変フラグメント（scFv）である。いくつかの実施形態では、scFvは、scFv重鎖ポリペプチドおよびscFv軽鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 はシングルドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、 A_1 は、それぞれがヒトCD3に特異的に結合することができる可変軽鎖および可変重鎖を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原は、CD3を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、抗CD3e単鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、CD3発現細胞上のCD3に対する $1\mu M$ 以下の K_D 結合を有する抗CD3e単鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、ムロモナブ-CD3（OKT3）、オテリキシズマブ（TRX4）、テプリズマブ（MGA031）、ビシズマブ（Nuvion）、SP34、X35、VIT3、BMA030（BW264/56）、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、FI11-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIIII-141、XIIII-46、XIIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16、および15865v19からなる群から選択される相補性決定領域（CDR）を含む。

【0055】

いくつかの実施形態では、 A_1 は、EGFRに結合する第1の抗原認識分子を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、それぞれがヒトEGFRに特異的に結合することができる可変軽鎖および可変重鎖を含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、CD3に結合するscFvは、scFv軽鎖可変ドメインおよびscFv重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、scFv重鎖可変ドメインは、表1に開示される少なくとも1つ、2つ、もしくは3つの相補性決定領域（CDR）、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列）を含む。いくつかの実施形態では、scFv軽鎖可変ドメインは、表1に開示される少なくとも1つ、2つ、もしくは3つの相補性決定領域（CDR）、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、少なくと

も 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する配列)を含む。

【0057】

いくつかの実施形態では、s c F v 重鎖可変ドメインは、表 1 に開示される少なくとも 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの相補性決定領域 (C D R)、またはそれと実質的に同一の配列 (例えば、少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する配列)を含むか、または、s c F v 軽鎖可変ドメインは、表 1 に開示される少なくとも 1 つ、2 つまたは 3 つの相補性決定領域 (C D R) またはそれと実質的に同一の配列 (例えば、少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する配列)を含む。

10

【0058】

20

30

40

50

【表 1－1】

表 1。抗 CD3 アミノ酸配列(IMG T ナンバリングシステムによって決定される複数の CDR)

構成の詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
SP34.185 CD3: LC: CDR1	TGAVTSGNY	1
SP34.185 CD3: LC: CDR2	GTK	2
SP34.185 CD3: LC: CDR3	VLWYSNRWV	3
SP34.185 CD3: HC: CDR1	GFTFNKYA	4
SP34.185 CD3: HC: CDR2	IRSKYNNYAT	5
SP34.185 CD3: HC: CDR3	VRHGNFGNSYISYWAY	6
SP34.194 CD3: LC: CDR1	TGAVTTSNY	7
SP34.194 CD3: LC: CDR2	GTN	8
SP34.194 CD3: LC: CDR3	ALWYSNLWV	9
SP34.194 CD3: HC: CDR1	GFTFNTYA	10
SP34.194 CD3: HC: CDR2	IRSKYNNYAT	11
SP34.194 CD3: HC: CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	12
SP34.185 scFv (VH－ リンカー1－ VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN	13

【表 1 - 2】

	YATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVL	
SP34.194 scFv (VL - リンカ -1 - VH)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVT LTCRSSTGAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIGGTNKRA PGTPARFSGSLLGGKAALT SGVQPEDEAEYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLKLSCAASGFTFN TYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNL	14

【 0 0 6 0 】
【表 1 - 3】

	KTEDTAVYYCVRHGNFGNS YVSWFAYWGQGLTVTVSS	
--	--	--

【0061】

いくつかの実施形態では、s c F v 軽鎖可変ドメインは、相補性決定領域 (CDR) である LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 を含み、s c F v 軽鎖可変ドメインの LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 は、配列番号1の LC-CDR1、配列番号2の LC-CDR2、および配列番号3の LC-CDR3 を含み、かつ CDR は、LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 のうち少なくとも1つにおいて0~2のアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、s c F v 軽鎖可変ドメインは、相補性決定領域 (CDR) である LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 を含み、s c F v 軽鎖可変ドメインの LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 は、配列番号7の LC-CDR1、配列番号8の LC-CDR2、および配列番号9の LC-CDR3 を含み、かつ CDR は、LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 のうち少なくとも1つにおいて0~2のアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、s c F v 重鎖可変ドメインは、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、s c F v 重鎖可変ドメインの HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号4の LC-CDR1、配列番号5の LC-CDR2、および配列番号6の LC-CDR3 を含み、かつ CDR は、HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 のうち少なくとも1つにおいて0~2のアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、s c F v 重鎖可変ドメインは、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、s c F v 重鎖可変ドメインの HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号10の LC-CDR1、配列番号11の LC-CDR2、および配列番号12の LC-CDR3 を含み、かつ CDR は、HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 のうち少なくとも1つにおいて0~2のアミノ酸修飾を含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、式 I の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、L₁ が腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断されるとエフェクター細胞に結合する。いくつかの実施形態では、式 I の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、L₁ が腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断され、かつ A₁ がエフェクター細胞に結合するとエフェクター細胞に結合する。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態では、A₁ は、エフェクター細胞上の TCR-CD3 複合体の一部であるポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、TCR-CD3 複合体の一部であるポリペプチドは、ヒト CD3 ϵ である。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、s c F v は相補性決定領域 (CDR) である LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 を含み、s c F v の LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 において、LC-CDR1 は配列番号1、LC-CDR2 は配列番号2、および LC-CDR3 は配列番号3であり、かつ s c F v は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、s c F v の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 において、HC-CDR1 は配列番号4、HC-CDR2 は配列番号5、および HC-CDR3 は配列番号6である。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、s c F v は、配列番号13に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、s c F v は CDR である LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 を含み、s c F v の LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 において、LC-CDR1 は配列番号7、LC-CDR2 は配列番号8、および LC-CDR3 は配列番号9であり、かつ s c F v は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、s c F v の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 において、HC-CDR1 は配列番号10、HC-CDR2 は配列番号11、および HC-CDR3 は配列番号12である。いくつか

の実施形態では、エフェクター細胞抗原はCD3を含み、scFvは、配列番号14に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原はCD3を含み、かつA₁は、CDRであるLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3を含み、A₁のLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3は、配列番号1のLC-CDR1、配列番号2のLC-CDR2、および配列番号3のLC-CDR3を含み、かつA₁は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、A₁のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号4のHC-CDR1、配列番号5のHC-CDR2、および配列番号6のHC-CDR3を含む。

10

【0064】

いくつかの実施形態では、エフェクター細胞抗原はCD3を含み、かつA₁は、CDRであるLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3を含み、A₁のLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3は、配列番号7のLC-CDR1、配列番号8のLC-CDR2、および配列番号9のLC-CDR3を含み、かつA₁は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、A₁のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号10のHC-CDR1、配列番号11のHC-CDR2、および配列番号12のHC-CDR3を含む。

20

【0065】

いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号13に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号13に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号13に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号13に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号13に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号13に対して少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号14に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号14に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号14に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号14に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号14に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、A₁は、配列番号14に対して少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0067】

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、P₁またはL₁を有さない単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性と比較して、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、P₁またはL₁を有さない単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の形態の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも5倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、P₁またはL₁を有さない単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の形態の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも8倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親

40

50

50

10

20

30

40

50

50

【 0 0 6 9 】

50

【 0 0 7 0 】

50

【 0 0 7 1 】

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、L₁が腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断されている単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体のT細胞溶解アッセイにおけるEC₅₀と比較して、T細胞溶解アッセイにおける増加したEC₅₀を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチド

50

40

50

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、 P_1 、 L_1 、 P_2 、または L_2 を有さない式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性と比較して、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、 P_1 、 L_1 、 P_2 、または L_2 を有さない式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の形態の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 10

50

10

20

30

40

50

親和性は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 400 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 500 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 600 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 700 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 800 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 900 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 1000 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍細胞抗原へのより弱い結合親和性を有し、この結合親和性は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の腫瘍細胞抗原への結合親和性より少なくとも 10000 倍高い。

10

20

30

40

50

【0075】

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、 P_1 、 L_1 、 P_2 、または L_2 を有さない式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の IFN γ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける EC₅₀ と比較して、IFN γ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける増加した EC₅₀ を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、IFN γ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける増加した EC₅₀ を有し、この EC₅₀ は、 P_1 、 L_1 、 P_2 、または L_2 を有さない式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の形態の IFN γ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける EC₅₀ より少なくとも 10 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、IFN γ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける増加した EC₅₀ を有し、この EC₅₀ は、 P_1 、 L_1 、 P_2 、または L_2 を有さない式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の形態の IFN γ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける EC₅₀ より少なくとも 50 倍高い。い

50

化アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、 P_1 、 L_1 、 P_2 、または L_2 を有さない式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の形態の $IFN\gamma$ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 1000 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、 $IFN\gamma$ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、 P_1 、 L_1 、 P_2 、または L_2 を有さない式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の形態の $IFN\gamma$ 放出 T 細胞活性化アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 10000 倍高い。

【0076】

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の T 細胞溶解アッセイにおける EC_{50} と比較して、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の T 細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 10 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の T 細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 50 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の T 細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 75 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の T 細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 100 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の T 細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 200 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の T 細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 300 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体の T 細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも 400 倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ (式 I a) は、T 細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式 I a の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド

10

20

30

40

50

30

40

50

40

50

50

によって L_1 および L_2 が切断されている式I aの単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体のT細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも800倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ （式I a）は、T細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式I aの単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体のT細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも900倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ （式I a）は、T細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式I aの単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体のT細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも1000倍高い。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体である $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ （式I a）は、T細胞溶解アッセイにおける増加した EC_{50} を有し、この EC_{50} は、腫瘍特異的なプロテアーゼによって L_1 および L_2 が切断されている式I aの単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体のT細胞溶解アッセイにおける EC_{50} より少なくとも1000倍高い。

10

【0079】

第2の抗原認識分子（ A_2 ）

いくつかの実施形態では、 A_2 は、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、 Fab 、または Fab' を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント（ $scFv$ ）、重鎖可変ドメイン（ VH ドメイン）、軽鎖可変ドメイン（ VL ドメイン）、ラクダ科動物由来のシングルドメイン抗体の可変ドメイン（ VHH ）を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、ヒト化されているかヒトである。いくつかの実施形態では、 A_2 は、 Fab または Fab' である。いくつかの実施形態では、 Fab または Fab' は、（a） Fab 軽鎖ポリペプチドおよび（b） Fab 重鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、 $EGFR$ 結合ドメインを含む。

20

【0080】

いくつかの実施形態では、 $EGFR$ に結合する抗原結合フラグメント（ Fab ）または Fab' は、 Fab 軽鎖ポリペプチド鎖および Fab 重鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 Fab 軽鎖ポリペプチドは、 Fab 軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、 Fab 重鎖ポリペプチドは、 Fab 重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、 Fab 重鎖可変ドメインは、表2に開示される少なくとも1つ、2つ、もしくは3つの相補性決定領域（ CDR ）、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列）を含む。いくつかの実施形態では、 Fab 軽鎖可変ドメインは、表2に開示される少なくとも1つ、2つ、もしくは3つの相補性決定領域（ CDR ）、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列）を含む。

30

40

【0081】

いくつかの実施形態では、 Fab 重鎖可変ドメインは、表2に開示される少なくとも1つ、2つ、もしくは3つの相補性決定領域（ CDR ）、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列）を含むか、または、 Fab 軽鎖可変ドメインは、表2に開示される少なくとも1つ、2つ、もしくは3つの相補性決定領域（ CDR ）、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列）を含む。

【0082】

50

【表 2】

表2。(IMGT ナンバリングシステムによって決定される) 抗 EGFR アミノ酸配列

構成の詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
EGFR: LC: CDR1	QSIGTN	15
EGFR: LC: CDR2	YAS	16
EGFR: LC: CDR3	QQNNNWPTT	17
EGFR: HC: CDR1	GFSLTNYG	18
EGFR: HC: CDR2	IWSGGNT	19
EGFR: HC: CDR3	ARALYYDYEFAY	20
EGFR Fab LC v1	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNI HWYQQRTNGSPRLLIK ^Y ASESISGIPSRFSGSG SGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT	21

【 0 0 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

	ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
EGFR Fab LC v2	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNI HWYQQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSG SGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	22
EGFR Fab HC	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTN YGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYN TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTSAASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC	23
EGFR Fab HC (N88Q)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTN YGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYN	24

【 0 0 8 4 】

10

20

30

40

50

【表 3－2】

	TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAI	
	YYCARALTYYYDYEFAYWGQGLVTVSAASTK	
	GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	
	VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS	
	VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV	
	EPKSC	

10

【0085】

いくつかの実施形態では、F a bは、相補性決定領域（CDR）であるLC－CDR 1、LC－CDR 2、およびLC－CDR 3を含み、F a bのLC－CDR 1、LC－CDR 2、およびLC－CDR 3は、配列番号15のLC－CDR 1、配列番号16のLC－CDR 2、および配列番号17のLC－CDR 3を含み、かつF a bは、CDRであるHC－CDR 1、HC－CDR 2、およびHC－CDR 3を含み、F a bのHC－CDR 1、HC－CDR 2、およびHC－CDR 3は、配列番号18のHC－CDR 1、配列番号19のHC－CDR 2、および配列番号20のHC－CDR 3を含む。いくつかの実施形態では、F a bは、相補性決定領域（CDR）であるLC－CDR 1、LC－CDR 2、およびLC－CDR 3を含み、F a bのLC－CDR 1、LC－CDR 2、およびLC－CDR 3は、配列番号15のLC－CDR 1、配列番号16のLC－CDR 2、および配列番号17のLC－CDR 3を含み、かつCDRは、HC－CDR 1、HC－CDR 2、またはHC－CDR 3のうち少なくとも1つにおいて0～2のアミノ酸修飾を含み、ならびに、F a bは、CDRであるHC－CDR 1、HC－CDR 2、およびHC－CDR 3を含み、F a bのHC－CDR 1、HC－CDR 2、およびHC－CDR 3は、配列番号18のHC－CDR 1、配列番号19のHC－CDR 2、および配列番号20のHC－CDR 3を含み、かつCDRは、LC－CDR 1、LC－CDR 2、またはLC－CDR 3のうち少なくとも1つにおいて0～2のアミノ酸修飾を含む。

20

30

【0086】

いくつかの実施形態では、A₂は、CDRであるLC－CDR 1、LC－CDR 2、およびLC－CDR 3を含み、A₂のLC－CDR 1、LC－CDR 2、およびLC－CDR 3は、配列番号15のLC－CDR 1、配列番号16のLC－CDR 2、および配列番号17のLC－CDR 3を含み、かつA₂は、相補性決定領域（CDR）であるHC－CDR 1、HC－CDR 2、およびHC－CDR 3を含み、A₂のHC－CDR 1、HC－CDR 2、およびHC－CDR 3は、配列番号18のHC－CDR 1、配列番号19のHC－CDR 2、および配列番号20のHC－CDR 3を含む。

40

【0087】

いくつかの実施形態では、F a b軽鎖ポリペプチドは、配列番号21に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、F a b軽鎖ポリペプチドは、配列番号21に記載されるものに対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、F a b軽鎖ポリペプチドは、配列番号21に記載されるものに対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態で

50

10

20

30

40

50

50

いくつかの実施形態では、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドは、 A_1 の単鎖可変フラグメント(s c F v)のC末端に結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドは、 A_1 の単鎖可変フラグメント(s c F v)のC末端に結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドは、 A_1 の単鎖可変フラグメント(s c F v)のN末端に結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドは、 A_1 のs c F v重鎖ポリペプチドに結合さ

れる。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv重鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv軽鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv軽鎖ポリペプチドに結合される。

【0092】

いくつかの実施形態では、 A_2 は、 P_2 および L_2 をさらに含み、 P_2 は、 A_2 に結合するペプチドを含み、かつ L_2 は、 A_2 を P_2 に接続し、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv重鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv重鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv軽鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv軽鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドに結合される。

【0093】

いくつかの実施形態では、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv重鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv重鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv軽鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドに結合される。いくつかの実施形態では、 A_2 のFab軽鎖ポリペプチドは、 A_1 のscFv軽鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 のFab重鎖ポリペプチドに結合される。

【0094】

ペプチド (P_1 および P_2 および P_{1a})

いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、表3に開示される配列、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、0、1、または2のアミノ酸修飾を有する配列）を含む。

【0095】

【表4】

表3. P_1 および P_2 および P_{1a} の配列

ペプチド	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
SP34.185 scFv マスク	VYCGPEFDES VGCM	25
EGFR Fab マスク	PCRS HIDVAKPICV	26
SP34.194 scFv マスク	GYLWGCEWNCAGITT	70

【0096】

いくつかの実施形態では、 P_1 は、第1の標的抗原への A_1 の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原への A_1 の結合を損なわせる。いく

つかの実施形態では、 P_1 は、イオン間相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 P_i スタッキング相互作用、および水素結合相互作用、またはこれらの組合せによって、 A_1 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、抗原結合部位で、またはその近くで A_1 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、 L_1 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A_1 から結合解除され、それによって A_1 をエフェクター細胞抗原に晒す。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、腫瘍特異的なプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ(MTSP1)、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して70%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して75%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して80%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して85%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して90%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して95%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して98%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して99%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して10%未満の配列同一性を共有するde novoアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、配列番号25に記載されるアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0097】

いくつかの実施形態では、 A_1 は、CD3に結合する抗体または抗体結合フラグメントを含む第1の抗原認識分子を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、配列番号25、797~835、もしくは843~1690のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号25、797~835、もしくは843~1690のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0098】

いくつかの実施形態では、 P_1 は、 $Z_1-Z_2-C-Z_4-P-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}-Z_{11}-Z_{12}-C-Z_{14}$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 Z_1 はD、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、およびPから選択され、 Z_2 はD、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、およびSから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はE、D、V、およびPから選択され、 Z_7 はW、L、F、V、G、M、I、およびYから選択され、 Z_8 はE、D、P、およびQから選択され、 Z_9 はE、D、Y、V、F、W、P、L、およびQから選択され、 Z_{10} はS、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、およびHから選択され、 Z_{11} はI、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、およびHから選択され、 Z_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、およびHから選択され、ならびに Z_{14} はD、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、およびSから選択される。いくつかの実施形態では、 Z_1 はD、Y、F、I、およびNから選択され、 Z_2 はD、Y、L、F、I、およびNから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はEおよびDから選択され、 Z_7 はW、L、F、およびVから選択され、 Z_8 はEおよびDから選択され、 Z_9 はE、D、Y、およびVから選択され、 Z_{10} はS、D、Y、T、およびIから選択され、 Z_{11} はI、Y、F、V、L、およびTから選択され、 Z_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、およびNから選択され、ならびに Z_{14} はD、Y、N、F、I、およびPから選択される。いくつかの実施形態では、 Z_1 はD、Y、およびFから選択され、 Z_2 はD、Y、L、およびFから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はEおよびDから選択され、 Z_7 はW、L、およびFから選択され、 Z_8 はEお

よびDから選択され、Z₉はEおよびDから選択され、Z₁₀はS、D、およびYから選択され、Z₁₁はI、Y、およびFから選択され、Z₁₂はF、D、Y、およびLから選択され、ならびにZ₁₄はD、Y、およびNから選択される。いくつかの実施形態では、P₁はU₁－U₂－C－U₄－P－U₆－U₇－U₈－U₉－U₁₀－U₁₁－U₁₂－C－U₁₄に記載されるアミノ酸配列を含み、U₁はD、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、およびPから選択され、U₂はD、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、およびSから選択され、U₄はGおよびWから選択され、U₆はE、D、V、およびPから選択され、U₇はW、L、F、V、G、M、I、およびYから選択され、U₈はE、D、P、およびQから選択され、U₉はE、D、Y、V、F、W、P、L、およびQから選択され、U₁₀はS、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、およびHから選択され、U₁₁はI、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、およびHから選択され、U₁₂はF、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、G、およびHから選択され、ならびにU₁₄はD、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、M、およびSから選択される。いくつかの実施形態では、U₁はD、Y、F、I、V、およびNから選択され、U₂はD、Y、L、F、I、およびNから選択され、U₄はGおよびWから選択され、U₆はEおよびDから選択され、U₇はW、L、F、G、およびVから選択され、U₈はEおよびDから選択され、U₉はE、D、Y、およびVから選択され、U₁₀はS、D、Y、T、およびIから選択され、U₁₁はI、Y、F、V、L、およびTから選択され、U₁₂はF、D、Y、L、I、V、A、G、およびNから選択され、ならびにU₁₄はD、Y、N、F、I、M、およびPから選択される。いくつかの実施形態では、U₁はD、Y、V、およびFから選択され、U₂はD、Y、L、およびFから選択され、U₄はGおよびWから選択され、U₆はEおよびDから選択され、U₇はW、L、G、およびFから選択され、U₈はEおよびDから選択され、U₉はEおよびDから選択され、U₁₀はS、D、T、およびYから選択され、U₁₁はI、Y、V、L、およびFから選択され、U₁₂はF、D、Y、G、A、およびLから選択され、ならびにU₁₄はD、Y、M、およびNから選択される。

10

20

【0099】

いくつかの実施形態では、P₁は、配列番号797～823のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、P₁は、配列番号25、824～835、および843～1690のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

30

【0101】

いくつかの実施形態では、P₁は、配列番号824～835のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0102】

いくつかの実施形態では、P₁は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号810のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0103】

いくつかの実施形態では、P₁は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号811のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0104】

いくつかの実施形態では、P₁は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号834のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、P₁は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0106】

50

いくつかの実施形態では、 P_1 は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列を含む。
【0107】

いくつかの実施形態では、 P_1 は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列を含む。
【0108】

いくつかの実施形態では、 P_2 は、第2の標的抗原への A_2 の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRへの A_2 の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、 P_2 は、イオン間相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π スタッキング相互作用、および水素結合相互作用、またはこれらの組合せによって、 A_2 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、抗原結合部位で、またはその近くで A_2 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、 L_2 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A_2 から結合解除され、それによって A_2 をEGFRに晒す。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、腫瘍特異的なプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ(MTSP1)、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して70%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して75%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して80%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して85%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して90%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して95%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して98%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して99%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、EGFRに対して10%未満の配列同一性を共有するde novoアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、配列番号26に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、配列番号115に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、配列番号116に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0109】

いくつかの実施形態では、 P_2 は、配列番号26、71~96、98~776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号26、71~96、98~776のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、 $X_1-C-X_2-X_3-X_4-X_5-D-X_6-A-X_7-P-X_8-C-X_9$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 X_1 はPおよびLから選択され、 X_2 はR、L、T、A、N、I、V、S、H、およびPから選択され、 X_3 はS、P、F、およびYから選択され、 X_4 はH、L、Q、P、R、F、Nから選択され、 X_5 はI、F、Y、H、N、T、S、D、A、L、およびVから選択され、 X_6 はT、P、N、L、I、V、S、D、H、A、およびYから選択され、 X_7 はKおよびYから選択され、 X_8 はI、P、L、およびMから選択され、ならびに X_9 はA、V、I、T、L、S、D、F、V、およびH(配列番号841)から選択される。いくつかの実施形態では、 X_1 はPおよびLから選択され、 X_2 はR、L、T、A、およびNから選択され、 X_3 はS、P、およびFから選択され、 X_4 はH、L、Q、およびPから選択され、 X_5 はI、F、Y、H、N、およびTから選択され、 X_6 はT、P、N、L、I、およびVから選択され、 X_7 はKであり、 X_8 はIであり、ならびに X_9 はA、V、I、T、L、およびSから選択される。いくつかの実施形態では、 X_1 はPであり、 X_2 はR、L、およびTから選択され、 X_3 はSであり、 X_4 はH、L、Q、およびPから選択され、 X_5 はI、F、Y、およびTから選択され、 X_6 はT、P、N、およびVから選択され、 X_7 はKであり、ならびに X_8 はIであり、ならびに X_9 はA、V、およびIから選択される。

【0110】

いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号26、86～96のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号26、86～96のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号26、86～96のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0111】

いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号98～776のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

10

【0112】

いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号99～118のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号99～118のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号99～118のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号26に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号26に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号26に記載されるアミノ酸配列を含む。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号115に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号115に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号115に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0115】

いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号116に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号116に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₂は、配列番号116に記載されるアミノ酸配列を含む。

30

【0116】

いくつかの実施形態では、P_{1a}は、L_{1a}が未切断のとき標的抗原への抗原認識分子の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、標的抗原は、抗CD3エフェクター細胞抗原である。いくつかの実施形態では、標的抗原は、上皮成長因子受容体（EGFR）である。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、標的抗原に対して70%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、標的抗原に対して75%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、標的抗原に対して80%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、標的抗原に対して85%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、標的抗原に対して90%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、標的抗原に対して95%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、標的抗原に対して98%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、標的抗原に対して99%未満の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、P_{1a}は、第2の標的抗原に対して10%未満の配列同一性を共有するdenovoアミノ酸配列を含む。

40

【0117】

いくつかの実施形態では、P_{1a}は、配列番号25、797～835、もしくは843

50

～1690のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号25、797～835、もしくは843～1690のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0118】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、 $Z_1-Z_2-C-Z_4-P-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}-Z_{11}-Z_{12}-C-Z_{14}$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 Z_1 はD、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、およびPから選択され、 Z_2 はD、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、およびSから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はE、D、V、およびPから選択され、 Z_7 はW、L、F、V、G、M、I、およびYから選択され、 Z_8 はE、D、P、およびQから選択され、 Z_9 はE、D、Y、V、F、W、P、L、およびQから選択され、 Z_{10} はS、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、およびHから選択され、 Z_{11} はI、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、およびHから選択され、 Z_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、およびHから選択され、ならびに Z_{14} はD、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、およびSから選択される。いくつかの実施形態では、 Z_1 はD、Y、F、I、およびNから選択され、 Z_2 はD、Y、L、F、I、およびNから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はEおよびDから選択され、 Z_7 はW、L、F、およびVから選択され、 Z_8 はEおよびDから選択され、 Z_9 はE、D、Y、およびVから選択され、 Z_{10} はS、D、Y、T、およびIから選択され、 Z_{11} はI、Y、F、V、L、およびTから選択され、 Z_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、およびNから選択され、ならびに Z_{14} はD、Y、N、F、I、およびPから選択される。いくつかの実施形態では、 Z_1 はD、Y、およびFから選択され、 Z_2 はD、Y、L、およびFから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はEおよびDから選択され、 Z_7 はW、L、およびFから選択され、 Z_8 はEおよびDから選択され、 Z_9 はEおよびDから選択され、 Z_{10} はS、D、およびYから選択され、 Z_{11} はI、Y、およびFから選択され、 Z_{12} はF、D、Y、およびLから選択され、ならびに Z_{14} はD、Y、およびNから選択される。いくつかの実施形態では、 P_1 は $U_1-U_2-C-U_4-P-U_6-U_7-U_8-U_9-U_{10}-U_{11}-U_{12}-C-U_{14}$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 U_1 はD、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、およびPから選択され、 U_2 はD、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、およびSから選択され、 U_4 はGおよびWから選択され、 U_6 はE、D、V、およびPから選択され、 U_7 はW、L、F、V、G、M、I、およびYから選択され、 U_8 はE、D、P、およびQから選択され、 U_9 はE、D、Y、V、F、W、P、L、およびQから選択され、 U_{10} はS、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、およびHから選択され、 U_{11} はI、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、およびHから選択され、 U_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、G、およびHから選択され、ならびに U_{14} はD、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、M、およびSから選択される。いくつかの実施形態では、 U_1 はD、Y、F、I、V、およびNから選択され、 U_2 はD、Y、L、F、I、およびNから選択され、 U_4 はGおよびWから選択され、 U_6 はEおよびDから選択され、 U_7 はW、L、F、G、およびVから選択され、 U_8 はEおよびDから選択され、 U_9 はE、D、Y、およびVから選択され、 U_{10} はS、D、Y、T、およびIから選択され、 U_{11} はI、Y、F、V、L、およびTから選択され、 U_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、G、およびNから選択され、ならびに U_{14} はD、Y、N、F、I、M、およびPから選択される。いくつかの実施形態では、 U_1 はD、Y、V、およびFから選択され、 U_2 はD、Y、L、およびFから選択され、 U_4 はGおよびWから選択され、 U_6 はEおよびDから選択され、 U_7 はW、L、G、およびFから選択され、 U_8 はEおよびDから選択され、 U_9 はEおよびDから選択され、 U_{10} はS、D、T、およびYから選択され、 U_{11} はI、Y、V、L、およびFから選択され、 U_{12} はF、D、Y、G、A、およびLから選択され、ならびに U_{14} はD、Y、M、およびNから選択される。

【0119】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号797～823のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0120】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号25、824～835、または843～1690のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号824～835のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号810のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0123】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号811のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0124】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号834のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0125】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、 P_{1a} は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、少なくとも5アミノ酸長のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、少なくとも6アミノ酸長のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、少なくとも10アミノ酸長のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、少なくとも10アミノ酸長かつ20アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、少なくとも16アミノ酸長のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、40アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、少なくとも2つのシステインアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、環状ペプチドまたは線状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、環状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、線状ペプチドを含む。

30

【0129】

いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、もしくは P_{1a} 、または、 P_1 、 P_2 、および P_{1a} は、修飾されたアミノ酸もしくは非天然アミノ酸、または修飾された非天然アミノ酸、またはこれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたアミノ酸または修飾された非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、もしくは P_{1a} 、または、 P_1 、 P_2 、および P_{1a} は、限定されないが、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合

40

50

、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 γ カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファーRNA媒介付加、およびユビキチン化を含む修飾を含む。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、および末端を含む任意の場所で、 P_1 、 P_2 、もしくは P_{1a} 、または、 P_1 、 P_2 、および P_{1a} になされる。

【0130】

いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、アルブミンまたはアルブミンフラグメントを含まない。いくつかの実施形態では、 P_1 、 P_2 、または P_{1a} は、アルブミン結合ドメインを含まない。

【0131】

連結部分 (L_1 、 L_2 、 L_3 、および L_{1a})

いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、少なくとも5～50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、少なくとも10～30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、少なくとも10のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、少なくとも18のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、少なくとも26のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、 $(G_2S)_n$ を含む式を有し、式中、 n は、1～3の整数（配列番号840）である。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、 $(G_2S)_n$ を含む式を有し、式中、 n は、少なくとも1の整数である。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ （配列番号836）、 $(GGGS)_n$ （配列番号837）、 $(GGGGS)_n$ （配列番号838）、および $(GSSGGS)_n$ （配列番号839）からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも1の整数である。いくつかの実施形態では、腫瘍特異的プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、およびアスパラギン酸プロテアーゼからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、ウロキナーゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリプターゼ（MTSP1）で切断可能なアミノ酸配列、レグマインで切断可能なアミノ酸配列、またはマトリックスメタロプロテアーゼで切断可能なアミノ酸配列を含む。いくつかの例では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む。いくつかの例では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ（MTSP1）、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。

【0132】

いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、表4に開示される配列、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、0、1、または2のアミノ酸修飾を有する配列）を含む。

【0133】

いくつかの実施形態では、 L_1 は、リンカー4（ISSGLLSGRSDAG）（配列番号66）、リンカー5（AAGLLAPPGGLSGRSDAG）（配列番号67）、リンカー6（SPLGLSGRSDAG）（配列番号68）、もしくはリンカー7（LSGRSDAGSPLGLAG）（配列番号69）のアミノ酸配列、または、リンカー4、リンカー5、リンカー6、もしくはリンカー7のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、リンカー4（ISSGLLSGRSDAG）（配列番号66）のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、リンカー5（AAGLLAPPGGLSGRSDAG）（配列番号67）のアミノ酸配列を含む。

G G L S G R S D A G) (配列番号 67) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L₁ は、リンカー 6 (S P L G L S G R S D A G) (配列番号 68) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L₁ は、リンカー 7 (L S G R S D A G S P L G L A G) (配列番号 69) のアミノ酸配列を含む。

【0134】

いくつかの実施形態では、L₂ は、リンカー 4 (I S S G L L S G R S D A G) (配列番号 66)、リンカー 5 (A A G L L A P P G G L S G R S D A G) (配列番号 67)、リンカー 6 (S P L G L S G R S D A G) (配列番号 68)、もしくはリンカー 7 (L S G R S D A G S P L G L A G) (配列番号 69) のアミノ酸配列、または、リンカー 4、リンカー 5、リンカー 6、もしくはリンカー 7 のアミノ酸配列に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L₂ は、リンカー 4 (I S S G L L S G R S D A G) (配列番号 66) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L₂ は、リンカー 5 (A A G L L A P P G G L S G R S D A G) (配列番号 67) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L₂ は、リンカー 6 (S P L G L S G R S D A G) (配列番号 68) のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、L₂ は、リンカー 7 (L S G R S D A G S P L G L A G) (配列番号 69) のアミノ酸配列を含む。

【0135】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 4。L₁、L₂、L₃、および L_{1a} の配列

構成の詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
リンカー1	GGGGSGGGGSGGGGS	27
リンカー2	GGGGS	28
リンカー3	GGGGSGGGGS	29
切断可能なリンカー1	GGGGSGGGLSGRSDAGSPLGLAGSGG GS	30
切断可能なリンカー2	GGGGSGGGLSGRSDAGSPLGLAGSGGS	31
切断可能なリンカー3	GGGGSSGGSAAAGLLAPPGGLSGRSDA GGGGS	32
切断可能なリンカー4	GSSGGSAAAGLLAPPGGLSGRSDAGGG GS	33
非切断型リンカー1	GGGGSGGGGSGGGGSGGASSGAGG S	34
非切断型リンカー2	GGGGSGGGSGGGGSGGASSGAGGSG GGS	35
リンカー4	ISSGLLSGRSDAG	66
リンカー5	AAGLLAPPGGLSGRSDAG	67
リンカー6	SPLGLSGRSDAG	68

【 0 1 3 6 】

【表 5 - 2】

リンカー7	LSGRSDAGSPLGLAG	69
-------	-----------------	----

【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態では、L₁は、A₁のN末端に結合される。いくつかの実施形態では、L₁は、A₁のC末端に結合される。いくつかの実施形態では、L₂は、A₂のN末

端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_2 は、 A_2 のC末端に結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、 L_1 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A_1 から結合解除され、それによって A_1 をエフェクター細胞抗原に晒す。いくつかの実施形態では、 P_2 は、 L_2 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A_2 から結合解除され、それによって A_2 をエフェクター細胞抗原に晒す。

【0138】

いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、修飾されたアミノ酸もしくは非天然アミノ酸、または修飾された非天然アミノ酸、またはこれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたアミノ酸または修飾された非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} は、限定されないが、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 γ カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファーRNA媒介付加、およびユビキチン化を含む修飾を含む。修飾は、ペプチド骨格を含む任意の場所か、またはアミノ酸側鎖で、 L_1 、 L_2 、 L_3 、または L_{1a} になされる。

【0139】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、プロテアーゼによって切断可能である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、健康な組織または病状を示さない微環境における濃度と比較して、より高濃度で病状を示す微環境において存在する。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、腫瘍特異的なプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、およびMMP14からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2を含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP7を含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP9を含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP13を含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP14を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ(MTSP1)、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ(MTSP1)、ウロキナーゼ、およびヘプシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ(MTSP1)を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、ウロキナーゼを含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、ヘプシンを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、様々なプロテアーゼによって切断される。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、または20を超える異なるプロテアーゼによって切断される。

【0140】

半減期延長分子(H_1 および H_{1a})

いくつかの実施形態では、 H_1 は、エフェクター細胞抗原への A_1 の結合を阻害しない。いくつかの実施形態では、 H_1 は、 H_1 を P_1 に接続する連結部分(L_3)を含む。いくつかの実施形態では、 H_{1a} は、エフェクター細胞抗原への第1の抗原認識分子の結合を阻害しない。いくつかの実施形態では、 H_{1a} は、 H_{1a} を P_{1a} に接続する連結部分(L_3)を含む。いくつかの実施形態では、半減期延長分子(H_1 または H_{1a})は、抗

原認識分子に対して結合親和性を有さない。いくつかの実施形態では、半減期延長分子（ H_1 または H_{1a} ）は、エフェクター細胞抗原に対して結合親和性を有さない。いくつかの実施形態では、半減期延長分子（ H_1 または H_{1a} ）は、エフェクター細胞抗原から抗原認識分子を遮蔽（*shield*）しない。いくつかの実施形態では、半減期延長分子（ H_1 または H_{1a} ）は、抗原認識分子に直接連結されない。

【0141】

いくつかの実施形態では、 H_1 または H_{1a} は、表5に開示される配列、またはそれと実質的に同一の配列（例えば、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する配列）を含む。

【0142】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5。H₁ および H_{1a} の配列

構成の詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
抗アルブミン: CDR-H1	GSTFYTAV	36
抗アルブミン: CDR-H2	IRWTALTT	37
抗アルブミン: CDR-H3	AARGTLGLFTTADSYDY	38
10G 抗アルブミン: CDR-H1	GFTFSKFG	39
10G 抗アルブミン: CDR-H2	ISGSGRDT	40
10G 抗アルブミン: CDR-H3	TIGGSLSV	41
抗アルブミン	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGSTFYTAVMGWVR QAPGKGLEWVAAIRWTALT TSYADSVKGRFTISRDKAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYC AARGTLGLFTTADSYDYWG QGTLVTVSS	42
10G 抗アルブミン	EVQLVESGGGLVQPGNSLR	43

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 7－1】

	LSCAAS <u>GFTFSKFG</u> MSWVRQ	
	APGKGLEWVSSIS <u>GSGR</u> DTL	
	YADSVKGRFTISRDNAKTTL	
	YLQMNSLRPEDTAVYYC <u>TIG</u>	
	<u>GSLSVSSQ</u> GTLVTVSS	

10

【0144】

いくつかの実施形態では、H₁またはH_{1a}は、反復配列モチーフ（repetitive sequence motif）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H₁またはH_{1a}は、高度に秩序付けられた二次構造（highly ordered secondary structure）を有するアミノ酸配列を含む。この文脈で用いられる「高度に秩序付けられた二次構造」は、H₁またはH_{1a}のアミノ酸残基の少なくとも約50％、または約70％、または約80％、または約90％が、限定されないが、分光光度法（例えば、「遠UV」スペクトル領域（190～250nm）における循環二色性分光法によるもの）、ならびに、Chou－FasmanアルゴリズムおよびGamier－Osguthorpe－Robson（「GOR」）アルゴリズムなどのコンピュータプログラムまたはアルゴリズムを含む手段によって測定または決定される二次構造に寄与することを意味する。

20

【0145】

いくつかの実施形態では、H₁またはH_{1a}は、ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態では、H₁は、アルブミンを含む。いくつかの実施形態では、H₁またはH_{1a}は、Fcドメインを含む。いくつかの実施形態では、アルブミンは、血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、H₁またはH_{1a}は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド、リガンド、または小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、またはCD35／CR1を結合する。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスチレチン、1－酸性糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む。いくつかの実施形態では、循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM、またはIgDを含む。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、アルブミンである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、シングルドメイン抗体、単鎖可変フラグメント、またはFabを含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、アルブミンに結合するシングルドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、645gH1gL1、645ds gH5gL4、23－13－A01－sc02、A10m3またはそのフラグメント、DOM7r－31、DOM7h－11－15、Alb－1、Alb－8、Alb－23、10G、10E、およびSA21からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域（CDR）であるHC

30

40

50

－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3は、配列番号36のHC－CDR1、配列番号37のHC－CDR2、および配列番号38のHC－CDR3を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域（CDR）であるHC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3は、配列番号36のHC－CDR1、配列番号37のHC－CDR2、および配列番号38のHC－CDR3を含み、ならびにCDRは、HC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3のうち少なくとも1つにおいて0～2のアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域（CDR）であるHC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3は、配列番号39のHC－CDR1、配列番号40のHC－CDR2、および配列番号41のHC－CDR3を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域（CDR）であるHC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3は、配列番号39のHC－CDR1、配列番号40のHC－CDR2、および配列番号41のHC－CDR3を含み、ならびにCDRは、HC－CDR1、HC－CDR2、およびHC－CDR3のうち少なくとも1つにおいて0～2のアミノ酸修飾を含む。

10

20

【0146】

いくつかの実施形態では、H₁は、配列番号42に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H₁は、配列番号42に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H₁は、配列番号42に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H₁は、配列番号42に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H₁は、配列番号42に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H₁は、配列番号42に対して少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0147】

いくつかの実施形態では、H_{1a}は、配列番号42に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H_{1a}は、配列番号42に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H_{1a}は、配列番号42に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H_{1a}は、配列番号42に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H_{1a}は、配列番号42に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H_{1a}は、配列番号42に対して少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0148】

いくつかの実施形態では、H₁は、配列番号43に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H₁は、配列番号43に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H₁は、配列番号43に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H₁は、配列番号43に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H₁は、配列番号43に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H₁は、配列番号43に対して少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0149】

いくつかの実施形態では、H_{1a}は、配列番号43に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、H_{1a}は、配列番号43に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H_{1a}は、配列番号43に対して少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H_{1a}は、配列番号43に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H_{1a}は、配列番号43に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。H_{1a}は、配列番号43に対して少

50

なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0150】

いくつかの実施形態では、 H_1 もしくは H_{1a} または H_1 および H_{1a} は、修飾されたアミノ酸もしくは非天然アミノ酸、または修飾された非天然アミノ酸、またはこれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたアミノ酸または修飾された非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、 H_1 もしくは H_{1a} または H_1 および H_{1a} は、限定されないが、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 γ カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファーRNA媒介付加、およびユビキチン化を含む修飾を含む。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、および末端を含む任意の場所で、 H_1 もしくは H_{1a} または H_1 および H_{1a} になされる。

10

【0151】

いくつかの実施形態では、 H_1 は、 H_1 を P_1 に接続する連結部分 (L_3) を含む。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも 5 ~ 50 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも 10 ~ 30 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも 10 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも 18 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも 26 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、(G_2S)_n、(GS)_n、($GS GGS$)_n (配列番号 836)、($GGGS$)_n (配列番号 837)、($GG GGS$)_n (配列番号 838)、および ($GSS GGS$)_n (配列番号 839) からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも 1 の整数である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、配列番号 29 に記載されるアミノ酸配列を含む。

20

【0152】

いくつかの実施形態では、 H_{1a} は、 H_{1a} を P_{1a} に接続する連結部分 (L_{1a}) を含む。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも 5 ~ 50 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも 10 ~ 30 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも 10 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも 18 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、少なくとも 26 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、(G_2S)_n、(GS)_n、($GS GGS$)_n (配列番号 836)、($GGGS$)_n (配列番号 837)、($GG GGS$)_n (配列番号 838)、および ($GSS GGS$)_n (配列番号 839) からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも 1 の整数である。いくつかの実施形態では、 L_{1a} は、配列番号 30 または 31 に記載されるアミノ酸配列を含む。

30

40

【0153】

EGFR および CD3 に結合する抗体

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、表 6 に開示されるアミノ酸配列、またはそれと実質的に同一の配列 (例えば、少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する配列) を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 44 ~ 61 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 50 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実

50

施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 51 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0154】

【表 8-1】

【表 6】

表 6。ポリペプチド複合体の配列

構成の詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
PC1: LC EGFR Fab LC	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK ~~Y~~ ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQ ~~Q~~ NNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	44
PC1: HC SP34.185 scFv (VH - リンカ ー 1 - VL) + リ ンカ - 2 + EGFR Fab HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS ~~Y~~ WAYWGQGTLTVTSSGGGSGGGGSGGGGSQTVVT QEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQOK PGQAPRGLIG ~~G~~ TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYC ~~V~~ LWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQ VQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSK SQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQG TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	45
PC2: LC EGFR Fab LC	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK ~~Y~~ ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQ ~~Q~~ NNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	46
PC2: HC SP34.194 scFv (VL - リンカ ー 1 - VH) + リンカ - 2 + EGFR Fab HC	QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQOKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYC ~~A~~ LWYSNLWVFGGGTKLTVLG GGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVTSSGGGGSQ VQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSK SQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQG TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	47

10

20

30

40

【0155】

50

【表 8 - 2】

PC3: LC EGFR Fab LC	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	48
PC3: HC SP34.194 scFv (VL - リンカ ー 1 - VH) + リンカー 2 + EGFR Fab HC	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQKPGQAPRGLIGGINKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTCLTVLG GGSGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNTYAMNWWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSQ VQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKLEWLGVWISGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSK SQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQG TLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	49
PC4: LC EGFR Fab マ スク + 切断 可能なリンカ ー 2 + EGFR Fab LC	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSGGLSGRSDAGSPLGLA GSGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH WYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL SINSVEEDIAADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	50
PC4: HC 抗アルブミン + リンカー 3 + SP34.185 scFv マスク + 切 断可能なリン カー 1 + SP34.185 scFv (VH - リンカ ー 1 - VL) + リ ンカー 2 + EGFR Fab HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFYTAVMGW VRQAPGKLEWVAAIRWTALTTSYADSVKGRFTISR GAKTTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADS YDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGVYCGPEFDES GCMGGGGSGGGLSGRSDAGSPLGLAGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWWVRQAP GKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQVQLK QSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPG KLEWLGVWISGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQV FKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVT VSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE	51

【 0 1 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
PC5: LC EGFR Fab マスク + 切断可能なリンカー 2 + EGFR Fab LC v2	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSGGLSGRSDAGSPLGLAGSGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYQCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	52
PC5: HC 10G+ リンカー 3 + SP34.185 scFv マスク + 切断可能なリンカー 1 + SP34.185 scFv (VH - リンカー 1 - VL) + リンカー 2 + EGFR Fab HC	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNARKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLTVTSSGGGGSGGGSGGVYCGPEFDESVCMMGGGGSGGLSGRSDAGSPLGLAGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLTVTSSGGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSGTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	53
PC6: LC EGFR Fab マスク + 非切断型リンカー 1 + EGFR Fab LC v2	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSGGGGGSGGGSGGGSGGASGAGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYQCQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	54
PC6: HC 10G+ リンカー 3 + SP34.185 scFv マスク + 非切断型リンカー 2 + SP34.185 scFv	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNARKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLTVTSSGGGGSGGGSGGVYCGPEFDESVCMMGGGGSGGGSGGGSGGASSGAGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLTVTSS	55

【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

(VH - リンカ ー1-VL) + リ ンカ - 2 + EGFR Fab HC (N88Q)	GGGSGGGSGGGSGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSS <u>TGAVTSGNY</u> PNWVQKPGQAPRGLIG <u>GTKFLA</u> PGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC <u>VLWY</u> <u>SNRWV</u> FGGGTKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGLVQPS QSLITCTVSG <u>FSLTNYG</u> VHWVRQSPGKGLEWLGVW <u>SGGNT</u> DYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQD TAIYYC <u>ARALTYDYEFAY</u> WGQGT LVTVSAASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
PC7: LC EGFR Fab マ スク + 切断 可能なリンカ ー3 + EGFR Fab LC v2	GGPCRSHIDVAKPICVGGGSGGSAAGLLAPPGGLS GRSDAGGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRAS <u>QSI</u> <u>GTNIH</u> WYQQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSG TDFTLINSVEEDIADYYC <u>QONNNWP</u> TTFGAGTKLE LKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	56
PC7: HC 10G + リンカ ー3 + SP34.185 scFv マスク + 切 断可能なリン カ - 4 + SP34.185 scFv (VH - リンカ ー1-VL) + リ ンカ - 2 + EGFR Fab HC (N88Q)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSCAAS <u>GFTFSKFG</u> MSWV RQAPGKGLEWVSS <u>ISGSGRDT</u> LYADSVKGRFTISRDN KTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC <u>TIGGSLSVSSQ</u> GT LVT VSSGGGSGGGSGGVYCGPEFDESVGCMGSSGGSA GLLAPPGGLSGRSDAGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSAAS <u>GFTFNKYA</u> MNWVRQAPGKGLEWVAR <u>IRS</u> <u>KYNNYAT</u> YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYC <u>VRHGNFGNSYISYWAY</u> WGQGT LVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLT GSST <u>TGAVTSGNY</u> PNWVQKPGQAPRGLIG <u>GTKFLA</u> P GTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC <u>VLWYS</u> <u>NRWV</u> FGGGTKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQ SLSITCTVSG <u>FSLTNYG</u> VHWVRQSPGKGLEWLGVW <u>GGNT</u> DYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDT AIYYC <u>ARALTYDYEFAY</u> WGQGT LVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSC	57
PC8: LC EGFR Fab マ スク + 切断 可能なリンカ ー2 + EGFR Fab LC v2	GGPCRSHIDVAKPICVGGGSGGLSGRSDAGSPLGLA GSGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRAS <u>QSIGTNIH</u> WYQQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL SINSVEEDIADYYC <u>QONNNWP</u> TTFGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	58

10

20

30

40

【 0 1 5 8 】

50

【表 8 - 5】

PC8: HC 抗アルブミン + リンカー3 + SP34.185 scFv マスク + 切 断可能なリン カー 1 + SP34.185 scFv (VH - リンカ ー1 - VL) + リ ンカー 2 + EGFR Fab HC (N88Q)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG STFYTA VMGW VRQAPGKGLEWVA AIRWTAL TSYADSVKGRFTISR DAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC AARGTLGLFTTADS YDYWGQ GTTLTVSSGGGGSGGGSGGVYCGPEFDES VGCMMGGGSGGGLSGRSDAGSPLGLAGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLKLSAAS GFTFNKY AMNWVRQAP GKGLEWVARIR SKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHGNF GNSYISYWAY WGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQT VVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTSGNY PNWVQKPGQA PRGLIG GTK FLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYY CVLWYSNRWV FGGGTKLTVLGGGGSQVQLK QSGPGLVQPSQSLITCTVSG FSLTNYG VHWVRQSPG KGLEWLGVI WSGGNT DYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVF FKMNSLQSQDTAIYYC ARALTYDYEFAY WGQGTTLV TVAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	59
PC9: LC EGFR Fab マ スク + 切断 可能なリンカ ー 2 + EGFR Fab LC v2	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSGGLSGRSDAGSPLGLA GSGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRAS QSIGTNI H WYQORTNGSPRLLIK YASE ISGIPSRFSGSGSGTDFTL SINSVEEDIAADYYC QONNNWPT TFGAGTKLELKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	60
PC9: HC 10G + リンカ ー 3 + SP34.185 scFv マスク + 切 断可能なリン カー 1 + SP34.185 scFv (VH - リンカ ー1 - VL) + リ ンカー 2 + EGFR Fab HC (N88Q)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSKFG MSWV RQAPGKGLEWVSS ISGSGRDT LYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSVSSQ GTTLV TVSSGGGGSGGGSGGVYCGPEFDESVCMMGGGSGG GLSGRSDAGSPLGLAGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSAAS GFTFNKY AMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYC VRHGNF GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS GGGGSGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSS TGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIG GTK FLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWY SNRWV FGGGTKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGLVQPS QSLITCTVSG FSLTNYG VHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNT DYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQD TAIYYC ARALTYDYEFAY WGQGTTLTVTVAASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN	61

【 0 1 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 6】

	VNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
PC10: LC SP34.185 scFv (VH - リンカ ー1-VL) + リ ンカ - 2 + EGFR Fab LC	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS YWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVT QEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQOK PGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQ ILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR NGSPRLIKYASISGISRFSGSGSGTDFTLINSVESE DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	62
PC10: HC EGFR Fab HC (N88Q)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWV RQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNS KSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQ GTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	63
PC11: LC 抗アルブミン + リンカー3 + SP34.185 scFv マスク + 切 断可能なリン カ - 1 + SP34.185 scFv (VH - リンカ ー1-VL) + リ ンカ - 2 + EGFR Fab LC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSKAASGSTFYTAVMGW VRQAPGKGLEWVAAIRWTALTTSYADSVKGRFTISR GAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARGTLGLFTTADS YDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGVYCGPEFDES GCMGGGGSGGSLGRSDAGSPLGLAGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQOKPGQA PRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQILLT QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR NGSPRLIKYASISGISRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIA DYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	64
PC11: HC EGFR Fab マ スク + 切断 可能なリンカ	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSGGLSGRSDAGSPLGLA GSGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNY GVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLS INKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEF	65

【0160】

【表 8 - 7】

- 2 + EGFR Fab HC (N88Q)	AYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSC	
--------------------------------	---	--

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

【0171】

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号64および配列番号65に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号64および配列番号65に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号64および配列番号65に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号64および配列番号65に対して少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0172】

ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、いくつかの実施形態において、表6に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、配列は、配列番号44~65のいずれか1つに対して、少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を含む。いくつかの例では、配列は、配列番号44~65に対して少なくともまたは約95%の相同性を含む。いくつかの例では、配列は、配列番号44~65に対して少なくともまたは約97%の相同性を含む。いくつかの例では、配列は、配列番号44~65に対して少なくともまたは約99%の相同性を含む。いくつかの例では、配列は、配列番号44~65に対して少なくともまたは約100%の相同性を含む。いくつかの例では、配列は、配列番号4、46、48、50、52、54、56、58、60、63、または65のいずれか1つの少なくともまたは約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、もしくは210を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む。いくつかの例では、配列は、配列番号45、47、49、51、53、55、57、59、または62のいずれか1つの少なくともまたは約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、もしくは450を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む。いくつかの例では、配列は、配列番号61または64のいずれか1つの少なくともまたは約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、もしくは640を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む。

20

30

【0173】

本明細書で使用されるように、配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」という用語は、最大のパーセント配列同一性を達成するために、必要に応じて配列をアラインメントしてギャップを導入した後に、かつ、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮することなく、特定の配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の割合として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当該技術分野内の様々な方法で、例えば、EMBOSS MATCHER、EMBOSS WATER、EMBOSS STRETCHER、EMBOSS NEEDLE、EMBOSS LALIGN、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを用いて達成可能である。当業者は、比較されている配列の完全長

40

50

での最大のアラインメントを達成するために必要とされるあらゆるアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。ALIGN-2がアミノ酸配列比較に使用される状況では、所与のアミノ酸配列B（所与のアミノ酸配列Bに対する%アミノ酸配列同一性を有するか、または含む所与のアミノ酸配列Aとして代替的に表現され得る）に対する、所与のアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性は、以下のように算出される：画分 X/Y を100倍し、ここで、Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2によって、そのプログラムのAとBの配列において同一マッチ（identical match）としてスコアリングされたアミノ酸残基の数であり、ここで、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の合計数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、A対Bの%アミノ酸配列同一性は、B対Aの%アミノ酸配列同一性と等しくないことを理解されたい。特段の定めのない限り、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して、直前のパラグラフに記載されているように、本明細書で使用される%アミノ酸配列同一性の値がすべて得られる。

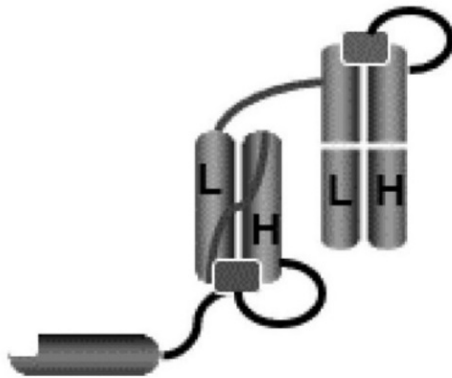
10

【0174】

いくつかの実施形態では、以下の構成1に記載される構造配置を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0175】

【化23】



20

構成1

30

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（scFv）を含み、scFvは、エフェクター細胞抗原へのscFvの結合を損なわせるペプチド（P₁）に連結しており、かつP₁は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分（L₁）によって、scFvの重鎖可変ドメインのN末端に連結しており、かつP₁は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体（EGFR）に結合するFabとにさらに連結しており、Fabは、Fab軽鎖ポリペプチドおよびFab重鎖ポリペプチドを含み、Fab軽鎖ポリペプチドは、scFvの軽鎖可変ドメインのC末端に連結しており、および、Fabは、P₂およびL₂に連結しており、P₂は、EGFRへの結合を損なわせるペプチドを含み、かつL₂は、Fab重鎖ポリペプチドをP₂に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、ポリペプチド複合体、が本明細書に開示される。

40

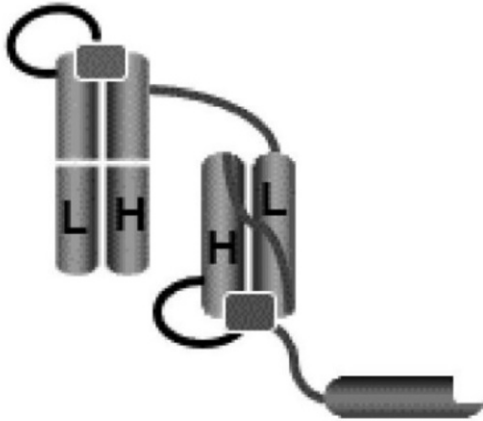
【0176】

いくつかの実施形態では、以下の構成2に記載される構造配置を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0177】

50

【化 2 4】



構成 2

10

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（s c F v）を含み、s c F vは、エフェクター細胞抗原へのs c F vの結合を損なわせるペプチド（P₁）に連結しており、かつP₁は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分（L₁）によって、s c F vの重鎖可変ドメインのN末端に連結しており、かつP₁は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体（EGFR）に結合するF a bとにさらに連結しており、F a bは、F a b軽鎖ポリペプチドおよびF a b重鎖ポリペプチドを含み、F a b重鎖ポリペプチドは、s c F vの軽鎖可変ドメインのC末端に連結しており、および、F a bは、P₂およびL₂に連結しており、P₂は、EGFRへの結合を損なわせるペプチドを含み、かつL₂は、F a b軽鎖ポリペプチドをP₂に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、ポリペプチド複合体、が本明細書に開示される。

20

【0178】

ポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードするポリヌクレオチド

30

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、F a bおよび単鎖可変フラグメント（s c F v）を含む。

【0179】

いくつかの実施形態では、以下の式Iに記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子であって、

【0180】

【化 2 5】

40



(式 I)

式中、A₁は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含み、P₁は、A

50

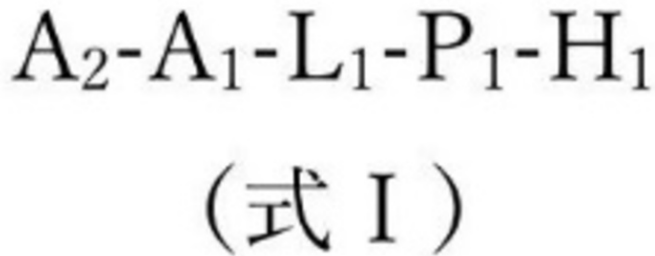
A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子を含み、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子を含む、単離された組換え核酸分子、である。

【0181】

いくつかの実施形態では、以下の式Iに記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子であって、

【0182】

【化26】



10

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子であり、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドであり、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分であり、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子であり、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子である、単離された組換え核酸分子、が本明細書に開示される。

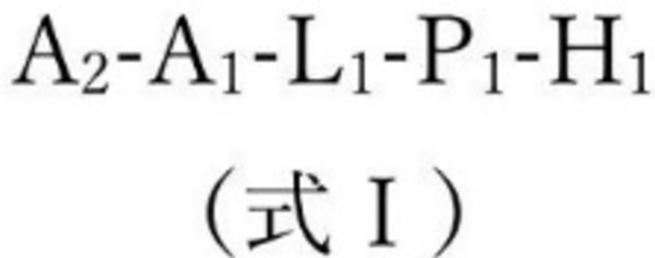
20

【0183】

いくつかの実施形態では、以下の式Iを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子であって、

【0184】

【化27】



30

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分を含み、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子を含み、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子を含む、単離された組換え核酸分子、が本明細書に開示される。

40

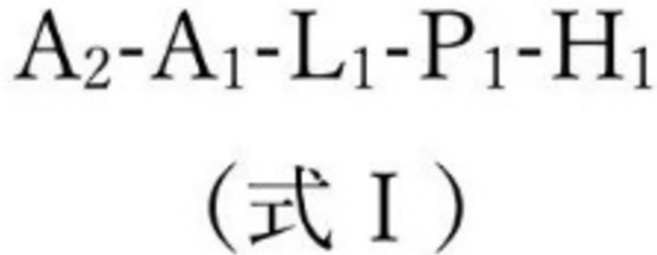
【0185】

いくつかの実施形態では、以下の式Iを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子であって、

【0186】

50

【化 2 8】



10

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子であり、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドであり、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続する連結部分であり、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質であり、 H_1 は、半減期延長分子であり、および、 A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子である、単離された組換え核酸分子、が本明細書に開示される。

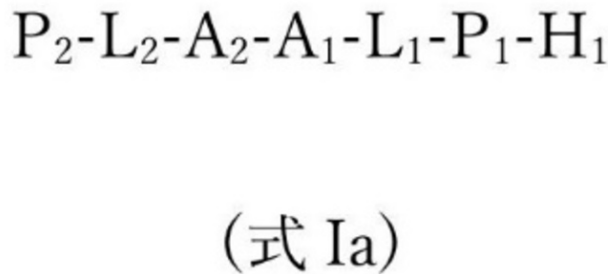
【0187】

いくつかの実施形態では、以下の式 Ia に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子が本明細書に開示される。

【0188】

【化 2 9】

20



【0189】

30

いくつかの実施形態では、以下の式 II に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子であって、

【0190】

【化 3 0】



40



式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断された連結部分を含み、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドを含み、および、 H_{1a} は、半減期延長分子を含む、単離された組換え核酸分子、が本明細書に開示される。

【0191】

50

いくつかの実施形態では、以下の式 I I を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子であって、

【0192】

【化31】



(式 I I)

10

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分を含み、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドを含み、および、 H_{1a} は、半減期延長分子を含む、単離された組換え核酸分子、が本明細書に開示される。

【0193】

20

いくつかの実施形態では、以下の式 I I に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子であって、

【0194】

【化32】



(式 I I)

30

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分であり、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドであり、および、 H_{1a} は、半減期延長分子である、単離された組換え核酸分子、が本明細書に開示される。

【0195】

40

いくつかの実施形態では、以下の式 I I を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子であって、

【0196】

50

【化 3 3】



(式 I I)

10

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分であり、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドであり、および、 H_{1a} は、半減期延長分子である、単離された組換え核酸分子、が本明細書に開示される。

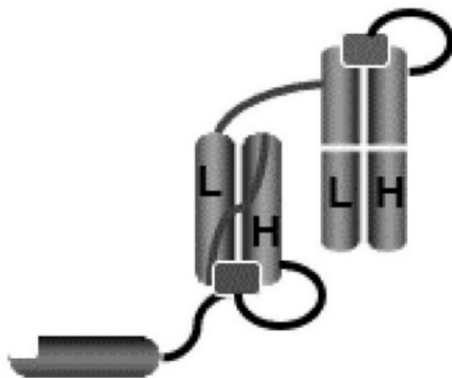
【0197】

いくつかの実施形態では、以下の構成1に記載される構造配置を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された核酸分子であって、

【0198】

20

【化 3 4】



30

構成 1

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（scFv）を含み、scFvは、エフェクター細胞抗原へのscFvの結合を損なわせるペプチド（ P_1 ）に連結しており、かつ P_1 は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分（ L_1 ）によって、scFvの重鎖可変ドメインのN末端に連結しており、かつ P_1 は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体（EGFR）に結合するFabとにさらに連結しており、Fabは、Fab軽鎖ポリペプチドおよびFab重鎖ポリペプチドを含み、Fab軽鎖ポリペプチドは、scFvの軽鎖可変ドメインのC末端に連結しており、および、Fabは、 P_2 および L_2 に連結しており、 P_2 は、EGFRへの結合を損なわせるペプチドを含み、かつ L_2 は、Fab重鎖ポリペプチドを P_2 に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、単離された核酸分子、が本明細書に開示される。

40

【0199】

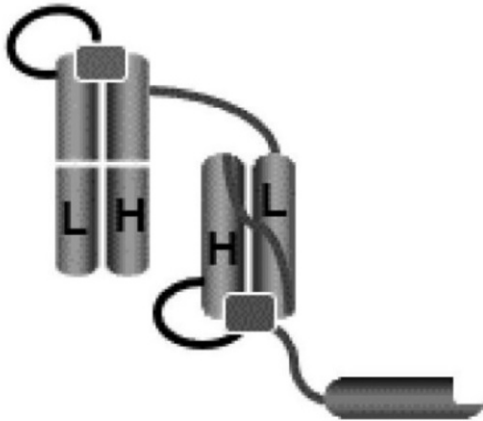
いくつかの実施形態では、以下の構成2に記載される構造配置を含むポリペプチドまた

50

はポリペプチド複合体をコードする単離された核酸分子であって、

【0200】

【化35】



構成2

10

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（s c F v）を含み、s c F vは、エフェクター細胞抗原へのs c F vの結合を損なわせるペプチド（P₁）に連結しており、かつP₁は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分（L₁）によって、s c F vの重鎖可変ドメインのN末端に連結しており、かつP₁は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体（EGFR）に結合するF a bとにさらに連結しており、F a bは、F a b軽鎖ポリペプチドおよびF a b重鎖ポリペプチドを含み、F a b重鎖ポリペプチドは、s c F vの軽鎖可変ドメインのC末端に連結しており、および、F a bは、P₂およびL₂に連結しており、P₂は、EGFRへの結合を損なわせるペプチドを含み、かつL₂は、F a b軽鎖ポリペプチドをP₂に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、単離された核酸分子、が本明細書に開示される。

20

30

【0201】

医薬組成物

いくつかの実施形態では、（a）本明細書に開示されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体および（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物が本明細書に開示される。

【0202】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式Iに記載される（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0203】

【化36】



（式I）

40

式中、A₁は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含み、P₁は、A

50

A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に結合させ、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含み、 H_1 は、半減期延長分子を含み、および A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

【0204】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式Iに記載される（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0205】

【化37】



（式I）

10

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子であり、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドであり、 L_1 は、 A_1 を P_1 に結合させ、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分であり、 H_1 は、半減期延長分子であり、および A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

20

【0206】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式Iを含む（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0207】

【化38】



（式I）

30

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に結合させ、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含み、 H_1 は、半減期延長分子を含み、および A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

40

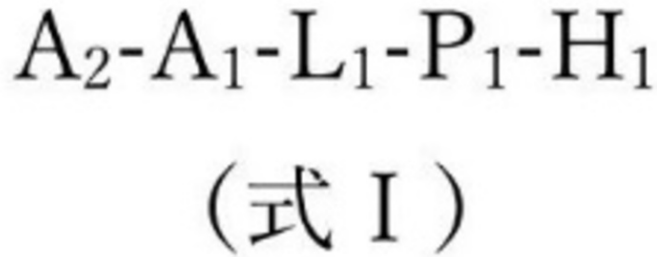
【0208】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式Iを含む（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0209】

50

【化 3 9】



10

式中、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子であり、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドであり、 L_1 は、 A_1 を P_1 に結合させ、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分であり、 H_1 は、半減期延長分子であり、および A_2 は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

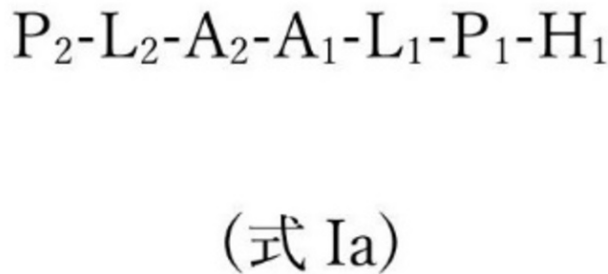
【0 2 1 0】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式 Ia に記載される（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、

【0 2 1 1】

【化 4 0】

20



および（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

30

【0 2 1 2】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式 II に記載される（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0 2 1 3】

【化 4 1】



40



式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断された連結部分を含み、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドを含み、および、 H_{1a} は、半減期延長分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

50

【0214】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式ⅠⅠを含む（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0215】

【化42】



10

（式ⅠⅠ）

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分を含み、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドを含み、および、 H_{1a} は、半減期延長分子を含む、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

20

【0216】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式ⅠⅠに記載される（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0217】

【化43】



30

（式ⅠⅠ）

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分であり、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドであり、および、 H_{1a} は、半減期延長分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

40

【0218】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下の式ⅠⅠを含む（a）ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0219】

50

【化 4 4】



(式 I I)

10

式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分であり、かつ第1の抗原認識分子は、上皮成長因子受容体（EGFR）に結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドであり、および、 H_{1a} は、半減期延長分子である、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む。

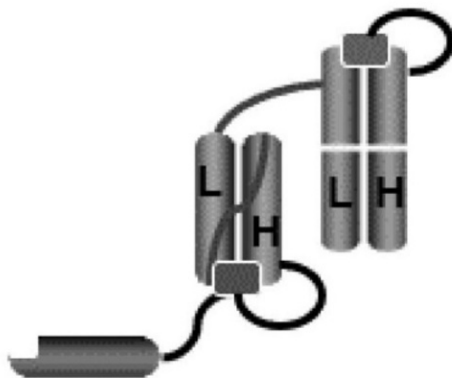
【0 2 2 0】

いくつかの実施形態では、以下の構成1に記載される構造配置を含む（a）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0 2 2 1】

20

【化 4 5】



30

構成 1

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（scFv）を含み、scFvは、エフェクター細胞抗原へのscFvの結合を損なわせるペプチド（ P_1 ）に連結しており、かつ P_1 は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分（ L_1 ）によって、scFvの重鎖可変ドメインのN末端に連結しており、かつ P_1 は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体（EGFR）に結合するFabとにさらに連結しており、Fabは、Fab軽鎖ポリペプチドおよびFab重鎖ポリペプチドを含み、Fab軽鎖ポリペプチドは、scFvの軽鎖可変ドメインのC末端に連結しており、および、Fabは、 P_2 および L_2 に連結しており、 P_2 は、EGFRへの結合を損なわせるペプチドを含み、かつ L_2 は、Fab重鎖ポリペプチドを P_2 に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド複合体、ならびに（b）薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物が本明細書に開示される。

40

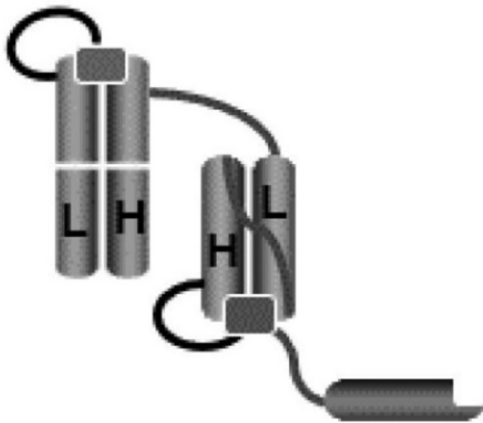
【0 2 2 2】

50

いくつかの実施形態では、以下の構成 2 に記載される構造配置を含む (a) ポリヌクレオチドまたはポリペプチド複合体であって、

【0223】

【化46】



構成 2

10

20

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント (s c F v) を含み、s c F v は、エフェクター細胞抗原への s c F v の結合を損なわせるペプチド (P₁) に連結しており、かつ P₁ は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分 (L₁) によって、s c F v の重鎖可変ドメインの N 末端に連結しており、かつ P₁ は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体 (E G F R) に結合する F a b とにさらに連結しており、F a b は、F a b 軽鎖ポリペプチドおよび F a b 重鎖ポリペプチドを含み、F a b 重鎖ポリペプチドは、s c F v の軽鎖可変ドメインの C 末端に連結しており、および、F a b は、P₂ および L₂ に連結しており、P₂ は、E G F R への結合を損なわせるペプチドを含み、かつ L₂ は、F a b 軽鎖ポリペプチドを P₂ に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド複合体、ならびに (b) 薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物が本明細書に開示される。

30

【0224】

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、検出可能な標識、治療薬、または薬物動態修飾部分 (p h a r m a c o k i n e t i c m o d i f y i n g m o i e t y) をさらに含む。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、蛍光標識、放射性標識、酵素、核酸プローブ、または造影剤を含む。

【0225】

対象への投与のために、本明細書に開示されるような単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、1 つ以上の薬学的に許容可能な担体または賦形剤とともに、医薬組成物で提供され得る。「薬学的に許容可能な担体」という用語は、限定されないが、成分の生物活性の有効性に干渉せず、および投与される患者に対して毒性ではない担体を含む。適切な医薬担体の例は、当該技術分野で周知であり、リン酸緩衝食塩水、水、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、様々なタイプの湿潤剤、無菌液などを含む。このような担体は、従来の方法によって製剤化することができ、適切な用量で対象に投与することができる。好ましくは、組成物は滅菌される。これらの組成物は、防腐剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントも含有し得る。微生物の作用の予防は、様々な抗菌剤および抗真菌剤を含めることによって確実なものとすることができる。

40

【0226】

医薬組成物は、(所望の投与方法に応じて) 任意の適切な形態であってよい。医薬組成

50

物は、単位剤形で提供されてもよく、密封された容器で提供されてもよく、キットの一部として提供されてもよい。そのようなキットは使用説明書を含んでもよい。それは複数の単位剤形を含んでもよい。

【0227】

医薬組成物は、非経口経路（例えば、皮下、筋肉内、または静脈内）経路を含む、任意の適切な経路による投与に適合させることができる。そのような組成物は、例えば、無菌条件下で活性成分を担体または賦形剤と混合することによって、薬学の技術分野で知られている任意の方法によって調製することができる。

【0228】

本開示の物質の用量は、処置される疾患または障害、処置される個体の年齢および状態などに応じて、広範な限界の間で変化し得、最終的に医師が使用すべき適切な用量を決定する。

【0229】

EGFRへの抗EGFR結合ドメインの結合を損なわせるペプチド

EGFRへの抗EGFR結合ドメインの結合を損なわせるペプチドに連結される抗EGFR結合ドメインを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体が本明細書に開示され、ペプチドは、配列番号26、71～96、98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または配列番号26、71～96、98～776のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0230】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号26、71～96、98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0231】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号26、86～96のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または配列番号26、86～96のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号26、86～96のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0233】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または配列番号98～776のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0234】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0235】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号99～118のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または配列番号99～118のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0236】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号99～118のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0237】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号71に記載されるアミノ酸配列、または配列番号71に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0238】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号71に記載されるアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

。

【0239】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号26に記載されるアミノ酸配列、または配列番号26に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0240】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号26に記載されるアミノ酸配列を含む。

。

【0241】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号115に記載されるアミノ酸配列、または配列番号115に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号115に記載されるアミノ酸配列を含む。

10

【0242】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号116に記載されるアミノ酸配列、または配列番号116に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号116に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0243】

EGFRへの抗EGFR結合の結合を損なわせるペプチドに連結される抗EGFR結合ドメインを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体が本明細書に開示され、ペプチドは、 $X_1-C-X_2-X_3-X_4-X_5-D-X_6-A-X_7-P-X_8-C-X_9$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 X_1 はPおよびLから選択され、 X_2 はR、L、T、A、N、I、V、S、H、およびPから選択され、 X_3 はS、P、F、およびYから選択され、 X_4 はH、L、Q、P、R、F、Nから選択され、 X_5 はI、F、Y、H、N、T、S、D、A、L、およびVから選択され、 X_6 はT、P、N、L、I、V、S、D、H、A、およびYから選択され、 X_7 はKおよびYから選択され、 X_8 はI、P、L、およびMから選択され、ならびに X_9 はA、V、I、T、L、S、D、F、V、およびH（配列番号841）から選択される。いくつかの実施形態では、 X_1 はPおよびLから選択され、 X_2 はR、L、T、A、およびNから選択され、 X_3 はS、P、およびFから選択され、 X_4 はH、L、Q、およびPから選択され、 X_5 はI、F、Y、H、N、およびTから選択され、 X_6 はT、P、N、L、I、およびVから選択され、 X_7 はKであり、 X_8 はIであり、ならびに X_9 はA、V、I、T、L、およびSから選択される。いくつかの実施形態では、 X_1 はPであり、 X_2 はR、L、およびTから選択され、 X_3 はSであり、 X_4 はH、L、Q、およびPから選択され、 X_5 はI、F、Y、およびTから選択され、 X_6 はT、P、N、およびVから選択され、 X_7 はKであり、ならびに X_8 はIであり、ならびに X_9 はA、V、およびIから選択される。

20

30

【0244】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号99～118のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号26に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号115に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号116に記載されるアミノ酸配列を含む。

40

【0245】

いくつかの実施形態では、抗EGFR結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、Fab、またはFab'を含む。いくつかの実施形態では、抗EGFR結合ドメインは、重鎖相補性決定領域であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、HC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3

50

は、配列番号 15 の H C - C D R 1、配列番号 16 の H C - C D R 2、および配列番号 17 の H C - C D R 3 を含み、かつ抗 E G F R 結合ドメインは、軽鎖相補性決定領域である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、F a b の L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 は、配列番号 18 の L C - C D R 1、配列番号 19 の L C - C D R 2、および配列番号 20 の L C - C D R 3 を含む。

【0246】

いくつかの実施形態では、抗体または抗体フラグメントは、F a b を含む。いくつかの実施形態では、抗 E G F R 結合ドメインは、配列番号 21 ~ 24 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0247】

いくつかの実施形態では、抗 E G F R 結合ドメインは、連結部分 (L_1) によってペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、 L_1 は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態では、 L_1 は、抗 E G F R 結合ドメインの N 末端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_1 は、抗 E G F R 結合ドメインの C 末端に結合される。いくつかの実施形態では、 L_1 は、少なくとも 5 ~ 50 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 は、少なくとも 10 ~ 30 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 は、少なくとも 10 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 は、少なくとも 18 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 は、少なくとも 26 のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_1 は、(G_2S) $_n$ を含む式を有し、式中、 n は、1 ~ 3 (配列番号 840) の整数である。いくつかの実施形態では、 L_1 は、(G_2S) $_n$ 、(GS) $_n$ 、(GS GG S) $_n$ (配列番号 836)、($GGGS$) $_n$ (配列番号 837)、($GGGG$ S) $_n$ (配列番号 838)、および (GSS $SGGS$) $_n$ (配列番号 839) からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも 1 の整数である。いくつかの実施形態では、ペプチドは、 L_1 が腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断されると抗 E G F R 結合ドメインから結合解除され、それによって抗 E G F R 結合ドメインを E G F R に晒す。いくつかの実施形態では、腫瘍特異的なプロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、およびアスパラギン酸プロテアーゼからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP 2、MMP 7、MMP 9、MMP 13、または MMP 14 を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ (MTSP1)、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、ウロキナーゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリプターゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリックスメタロプロテアーゼで切断可能なアミノ酸配列、またはレグマインで切断可能なアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、配列番号 30 または 31 のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、配列番号 27 ~ 35 に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 は、リンカー 4 (ISSGLLSGRSDAG) (配列番号 66)、リンカー 5 (AAGLLAPPGGLSGRSDAG) (配列番号 67)、リンカー 6 (SPLGLSGRSDAG) (配列番号 68)、もしくはリンカー 7 (LSGRSDAGSPLGLAG) (配列番号 69) のアミノ酸配列、または、リンカー 4、リンカー 5、リンカー 6、もしくはリンカー 7 のアミノ酸配列に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0248】

いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、半減期延長分子 (H_1) をさらに含む。いくつかの実施形態では、半減期延長分子は、ペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、 H_1 は、ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール (PEG) である。いくつかの実施形態では、 H_1 は、アルブミンを含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は、Fc ドメインを含む

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態では、アルブミンは、血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、 H_1 は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド、リガンド、または小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、またはCD35/CR1を結合する。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスチレチン、1-酸性糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む。いくつかの実施形態では、循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM、またはIgDを含む。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、アルブミンである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、シングルドメイン抗体、単鎖可変フラグメント、またはFabを含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、アルブミンに結合するシングルドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、645gH1gL1である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、645ds gH5gL4である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、23-13-A01-sc02である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、A10m3またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、DOM7r-31である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、DOM7h-11-15である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、Alb-1、Alb-8、またはAlb-23である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、10Eである。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号36のHC-CDR1、配列番号37のHC-CDR2、および配列番号38のHC-CDR3を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、配列番号69に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域(CDR)であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号36のHC-CDR1、配列番号37のHC-CDR2、および配列番号38のHC-CDR3を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、配列番号42に記載されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体は、SA21である。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、修飾されたアミノ酸、非天然アミノ酸、修飾された非天然アミノ酸、またはこれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたアミノ酸または修飾された非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は、 H_1 をペプチドに接続する連結部分(L_3)を含む。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも5~50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも10~30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも10のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも18のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、少なくとも26のアミノ酸を有するペプチド配列である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (配列番号836)、 $(GGGS)_n$ (配列番号837)、 $(GGGGS)_n$ (配列番号838)、および $(GSSGGG)_n$ (配列番号839)からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも1の整数である。いくつかの実施形態では、 L_3 は、配列番号29に記載されるアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0249】

処置方法

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、癌を処置する方法において用いられる。いくつかの実施形態では、癌は、EGFRを発現する細胞を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、大腸癌（CRC）、頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）、非小細胞肺癌（NSCLC）、前立腺癌、乳癌、大腸癌、頭頸部癌、食道胃癌、肝臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、腎臓癌、または脾臓癌を処置する方法において用いられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、EGFR阻害薬治療に対して耐性を示す対象を処置する方法において用いられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、KRAS突然変異を有する対象を処置する方法において用いられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、EGFR阻害薬治療に対して耐性を示し、かつKRAS突然変異を有する対象を処置する方法において用いられる。

10

【0250】

いくつかの実施形態では、長半減期を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体が本明細書に記載される。いくつかの例では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体の半減期は、少なくともまたは約12時間、24時間36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、100時間、108時間、120時間、140時間、160時間、180時間、200時間、もしくは200時間を超える。いくつかの例では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体の半減期は、少なくともまたは約12時間、24時間36時間、48時間、60時間、72時間、84時間、96時間、100時間、108時間、120時間、140時間、160時間、180時間、200時間、もしくは200時間を超える。いくつかの例では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体の半減期は、約12時間～約300時間、約20時間～約280時間、約40時間～約240時間、約60時間～約200時間、または約80時間～約140時間の範囲である。

20

【0251】

いくつかの実施形態では、週1回投与されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回、静脈内投与、筋肉内投与、病巣内投与、局所投与、皮下投与、輸液投与、または経口投与される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、ボーラス注射によって週1回投与される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、持続注入によって週1回投与される。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、60分以下の期間に渡って持続注入として週1回対象に投与される。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、30分以下の期間に渡って持続静脈内注入として週1回対象に投与される。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも10分の期間に渡って持続静脈内注入として週1回対象に投与される。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも30時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも50時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも60時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも70時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも80時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまた

30

40

50

はポリペプチド複合体は、少なくとも90時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも100時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも110時間の半減期を有する。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、週1回対象に投与され、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、少なくとも115時間の半減期を有する。

【0252】

E G F RおよびC D 3に結合する抗体の産生

10

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、抗体とその結合フラグメント）は、とりわけ、化学合成によって、または組換え発現によって、ポリペプチド（例えば、抗体）の合成に役立つように当該技術分野で知られている任意の方法を使用して生成され、および、好ましくは組換え発現技術によって生成される。

【0253】

いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは組換え発現され、抗体またはその結合フラグメントをコードする核酸は、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから（例えば、Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242に記載されるように）組み立てられ、これは、抗体をコードする配列の一部を含有する重複オリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングとライゲーション、および、その後のPCRによるライゲートされたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

20

【0254】

代替的に、抗体をコードする核酸分子は、配列の3'末端と5'末端へハイブリダイズすることができる合成プライマーを使用するPCR増幅によって、あるいは特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用してクローンを作ることによって、適切なソース（例えば、抗体cDNAライブラリー、または免疫グロブリンを発現する任意の組織もしくは細胞から生成されたcDNAライブラリー）から任意選択的に生成される。

【0255】

いくつかの例では、抗体またはその結合は、ポリクローナル抗体を産生するためにマウスなどの動物を免疫化することにより、または、より好ましくは、例えば、KohlerおよびMilstein (1975, Nature 256:495-497) によって記載されるように、または、Kozborら (1983, Immunology Today 4:72)、あるいはColeら (1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) によって記載されるように、モノクローナル抗体を産生することによって、任意選択的に生成される。代替的に、抗体の少なくともFab部分をコードするクローンは、特異的抗原に結合するFabフラグメントのクローンについてFab発現ライブラリーをスクリーニングすることにより（例えば、Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281に記載される）、または抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより（Clackson et al., 1991, Nature 352:624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937を参照）、任意選択的に得られる。

30

40

【0256】

いくつかの実施形態では、適切な生物学的活性のマウス抗体分子からの遺伝子と一緒に、適切な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることにより、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Tak

50

eda et al., 1985, Nature 314:452-454) が使用される。キメラ抗体は、異なる部分が、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域、およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する動物種などの様々な動物種に由来する分子である。

【0257】

いくつかの実施形態では、一本鎖抗体の産生について記載された技術 (U. S. Pat. No. 4,694,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54) は、一本鎖抗体を産生するために適合される。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋によって Fv 領域の重鎖および軽鎖のフラグメントを結合することによって形成され、結果として一本鎖ポリペプチドを生じさせる。大腸菌中の機能的な Fv フラグメントの組み立てのための技術も任意選択で使用される (Skerratt et al., 1988, Science 242:1038-1041)。

10

【0258】

いくつかの実施形態では、抗体のヌクレオチド配列を含む発現ベクターまたは抗体のヌクレオチド配列は、従来の技術 (例えば、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、および、リン酸カルシウム沈澱反応) によって宿主細胞に導入され、トランスフェクトされた細胞はその後、従来の技術によって培養されて、抗体を産生する。特定の実施形態では、抗体の発現は、構成的な、誘導可能な、または組織特異的なプロモーターによって調節される。

20

【0259】

いくつかの実施形態では、様々な宿主発現ベクター系が、本明細書に記載される抗体またはその結合フラグメントを発現するために利用される。そのような宿主発現系は、抗体のコード配列が生成され、その後精製されるビヒクルを表すだけでなく、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換されるか、またはトランスフェクトされるときに、抗体またはその結合フラグメントをインサイチュで発現する細胞も表す。これらは、限定されないが、組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、または抗体もしくはその結合フラグメントコード配列を含むコスミド DNA 発現ベクターで形質転換された細菌 (例えば、大腸菌と枯草菌) などの微生物; 抗体またはその結合フラグメントコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母 (例えば、サッカロミセス・ピキア); 抗体またはその結合フラグメントコード配列を含む組換えウイルス発現ベクター (例えば、バキュロウイルス) に感染した昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター (例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) およびタバコモザイクウイルス (TMV)) に感染した、あるいは、抗体またはその結合フラグメントコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター (例えば、Ti プラスミド) で形質転換された植物細胞系; あるいは、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター (例えば、メタロチオネインプロモーター)、または、哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター (例えば、アデノウイルス後期プロモーター; ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター) を含む、組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系 (例えば、COS、CHO、BH、293、293T、3T3 細胞) を含む。

30

40

【0260】

組換えタンパク質の長期的かつ高収率の生成のためには、安定した発現が好ましい。いくつかの例では、安定して抗体を発現する細胞株が任意選択的に操作される。ウイルスの複製開始点を含む発現ベクターを使用するのではなく、宿主細胞は、適切な発現制御要素 (例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など) および選択可能なマーカーによって制御された DNA で形質転換される。外来性 DNA の導入後に、操作した細胞を富化培地で 1~2 日間成長させ、その後、選択培地に切り替える。組換えプラスミドにおける選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を与え、細胞がプラスミドをその染色体に安定的に統合し、成長してフォーカスを形成すること

50

をできるようにし、フォーカスはクローン化されて細胞株へと拡大する。この方法は、抗体またはその結合フラグメントを発現する細胞株を操作するために有利に使用することができる。

【0261】

いくつかの例では、限定されないが、それぞれ tk 細胞、hgprt 細胞、または aprt 細胞で利用される、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 遺伝子を含む多くの選択系が使用される。同様に、代謝拮抗薬の耐性は、以下の遺伝子の選定基準として使用される：メトトレキサートに対する耐性を与える dhfr (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527)；ミコフェノール酸に対する耐性を与える gpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)；アミノグリコシド G-418 (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; および Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May 1993, TIB TECH 11(5):155-215) に対する耐性を与える neo、ならびにヒグロマイシンに対する耐性を与える hygromycin (Santerre et al., 1984, Gene 30:147)。使用可能な組換え DNA 技術の技術分野で一般的に知られている方法は、Ausubel et al. (eds., 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colbere-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1) に記載される。

【0262】

いくつかの例では、抗体の発現レベルは、ベクター増幅によって増加する（検討のために、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987を参照)）。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルが増加すると、マーカー遺伝子のコピーの数が増加する。増幅領域が抗体のヌクレオチド配列に関連しているため、抗体の産生も増加する (Crouse et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3:257)。

【0263】

いくつかの例では、当該技術分野で知られている抗体の精製のための任意の方法は、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、とりわけ、プロテイン A の後の特異的な抗原への親和性、および、サイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離

、差次的溶解性によって、またはタンパク質の精製のための他の標準的な技術によって使用される。

【0264】

発現ベクター

いくつかの実施形態では、ベクターは、真核生物または原核生物の供給源に由来するあらゆる適切なベクターを含む。場合によっては、ベクターは、細菌（例えば *E. coli*）、昆虫、酵母（例えば、*Pichia pastoris*）、藻類、または哺乳動物の供給源から得られる。例示的な細菌ベクターは、pACYC177、pASK75、pBADベクター系、pBADMBベクター系、pETベクター系、pETMBベクター系、pGEXベクター系、pHAT、pHAT2、pMal-c2、pMal-p2、pQEベクター系、pRSET A、pRSET B、pRSET C、pTrcHis2系、pZ A31-Luc、pZE21-MCS-1、pFLAG AT5、pFLAG CTS、pFLAG MAC、pFLAG Shift-12c、pTAC-MAT-1、pFLAG CTC、またはpTAC-MAT-2を含む。

10

【0265】

例示的な昆虫ベクターは、pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBact M30b、pFastBac、M30c、pVL1392、pVL1393、pVL1393 M10、pVL1393 M11、pVL1393 M12、FLAGベクター、例えば、pPolh-FLAG1またはpPolh-MAT 2、あるいはMATベクター、例えば、pPolh-MAT1、またはpPolh-MAT2を含む。

20

【0266】

場合によっては、酵母ベクターは、Gateway（登録商標）pDEST（商標）14ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）15ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）17ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）24ベクター、Gateway（登録商標）pYES-DEST52ベクター、pBAD-DEST49 Gateway（登録商標）デスティネーションベクター、pAO815 *Pichia*ベクター、pFLD1 *Pichia pastoris*ベクター、pGAPZA、B、およびCの*Pichia pastoris*ベクター、pPIC3.5K *Pichia*ベクター、pPIC6 A、B、およびCの*Pichia*ベクター、pPIC9K *Pichia*ベクター、pTEF1/Zeo、pYES2酵母ベクター、pYES2/CT酵母ベクター、pYES2/NT A、B、およびCの酵母ベクター、またはpYES3/CT酵母ベクターを含む。

30

【0267】

例示的な藻類ベクターはpChlamy-4ベクターまたはMCSベクターを含む。

【0268】

哺乳動物ベクターの例は、一過性発現ベクターまたは安定した発現ベクターを含む。哺乳動物の一過性発現ベクターは、pRK5、p3xFLAG-CMV 8、pFLAG-Myc-CMV 19、pFLAG-Myc-CMV 23、pFLAG-CMV 2、pFLAG-CMV 6a、b、c、pFLAG-CMV 5.1、pFLAG-CMV 5a、b、c、p3xFLAG-CMV 7.1、pFLAG-CMV 20、p3xFLAG-Myc-CMV 24、pCMV-FLAG-MAT1、pCMV-FLAG-MAT2、pBICEP-CMV 3、または、pBICEP-CMV 4を含み得る。哺乳動物の安定した発現ベクターは、pFLAG-CMV 3、p3xFLAG-CMV 9、p3xFLAG-CMV 13、pFLAG-Myc-CMV 21、p3xFLAG-Myc-CMV 25、pFLAG-CMV 4、p3xFLAG-CMV 10、p3xFLAG-CMV 14、pFLAG-Myc-CMV 22、p3xFLAG-Myc-CMV 26、pBICEP-CMV 1、またはpBICEP-CMV 2を含み得る。

40

50

【0269】

いくつかの例では、無細胞系は、細胞からの細胞質成分および／または核成分の混合物であり、インビトロでの核酸合成に使用される。場合によっては、無細胞系は原核細胞成分または真核細胞成分のいずれかを利用する。しばしば、核酸合成は、例えば、ショウジョウバエ細胞 (*Drosophila cell*)、ツメガエル卵子 (*Xenopus egg*)、またはHeLa細胞に基づいた無細胞系において得られる。例示的な無細胞系は、限定されないが、大腸菌S30抽出物系、大腸菌T7 S30系、またはPURExpress (登録商標) を含む。

【0270】

宿主細胞

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、任意の適切な細胞、例えば、天然由来の細胞または遺伝子組換えされた細胞を含む。いくつかの例では、宿主細胞は産生宿主細胞である。いくつかの例では、宿主細胞は真核細胞である。他の例では、宿主細胞は原核細胞である。場合によっては、真核細胞は真菌 (例えば、酵母菌)、動物細胞、または植物細胞を含む。場合によっては、原核細胞は細菌細胞である。細菌細胞の例はグラム陽性菌またはグラム陰性菌を含む。しばしば、グラム陰性菌は嫌気性、桿状、またはその両方である。

【0271】

いくつかの例では、グラム陽性菌は放線菌門 (*Actinobacteria*)、ファームキューテス門 (*Firmicutes*)、またはテネリクテス門 (*Tenericutes*) を含む。場合によっては、グラム陰性菌は、アクウィフェクス門 (*Aquificae*)、デイノコッカス-サーマス門 (*Deinococcus-Thermus*)、フィプロバクター門 (*Fibrobacteres*)、クロロビウム門 (*Chlorobi*) / バクテロイデス門 (*Bacteroidetes*) (FCB群)、フソバクテリア門 (*Fusobacteria*)、ゲンマティモナス門 (*Gemmatimonadetes*)、ニトロスピラ門 (*Nitrospirae*)、プランクトミケス門 (*Planctomycetes*)、ベルコミクロビウム門 (*Verrucomicrobia*) / クラミジア属 (*Chlamydiae*) (PVC群)、プロテオバクテリア (*Proteobacteria*)、スピロヘータ門 (*Spirochaetes*)、またはシネルギステス門 (*Synergistetes*) を含む。他の細菌は、アシドバクテリア門 (*Acidobacteria*)、緑色非硫黄細菌門 (*Chloroflexi*)、クリシオゲネス門 (*Chrysiogenetes*)、シアノバクテリア (*Cyanobacteria*)、デフェリバクター門 (*Deferribacteres*)、ディクチオグロムス門 (*Dictyoglomi*)、サーモデスルフobacteria門 (*Thermodesulfobacteria*)、またはテルモトガ門 (*Thermotogae*) であり得る。細菌細胞は大腸菌、ボツリヌス菌、または大腸菌であり得る。

【0272】

例示的な原核生物宿主細胞は、限定されないが、BL21、Mach1 (商標)、DH10B (商標)、TOP10、DH5 α 、DH10Bac (商標)、OmniMax (商標)、MegaX (商標)、DH12S (商標)、INV110、TOP10F'、INV α F、TOP10/P3、ccdB Survival、PIR1、PIR2、Stbl2 (商標)、Stbl3 (商標)、またはStbl4 (商標) を含む。

【0273】

いくつかの例では、動物細胞は脊椎動物または無脊椎動物に由来する細胞を含む。場合によっては、動物細胞は、海洋無脊椎動物、魚、昆虫、両生類、爬虫類、または哺乳動物に由来する細胞を含む。場合によっては、真菌細胞は、ビール酵母、パン酵母、またはワイン酵母などの酵母菌を含む。

【0274】

真菌は子嚢菌、例えば、酵母菌、カビ、糸状菌、担子菌、または接合菌を含む。いくつかの例では、酵母菌は子嚢菌または担子菌を含む。場合によっては、子嚢菌は、サッカロミケス亜門 (*Saccharomycotina*) (真正酵母菌、例えば、ビール酵母菌

10

20

30

40

50

)(パン酵母))またはタフリナ菌亜門(*Taphrinomycotina*)(例えば、シゾサッカロミセス綱(*Schizosaccharomycetes*)(分裂酵母))を含む。場合によっては、担子菌はハラタケ亜門(*Agaricomycotina*)(例えば、シロキクラゲ綱(*Tremellomycetes*))またはサビキン亜門(*Pucciniomycotina*)(例えば、ミクロボトリウム菌綱(*Microbotryomycetes*))を含む。

【0275】

例示的な酵母菌または糸状菌は、例えば、属：サッカロマイセス(*Saccharomyces*)、シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)、カンジダ(*Candida*)、ピチア(*Pichia*)、ハンゼヌラ(*Hansenula*)、クルイベロマイセス(*Kluyveromyces*)、チゴサッカロマイセス(*Zygosaccharomyces*)、ヤロウイア(*Yarrowia*)、トリコスポロン(*Trichosporon*)、ロドスポリジウム(*Rhodosporidi*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、フザリウム属(*Fusarium*)、またはトリコデルマ属(*Trichoderma*)を含む。例示的な酵母菌または糸状菌は、例えば、種：サッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、カンジダ・ウチリス(*Candida utilis*)、カンジダ・ボイディニ(*Candida boidini*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス(*Candida tropicalis*)、カンジダ・ステラトイディ(*Candida stellatoidea*)、カンジダ・グラブラタ(*Candida glabrata*)、カンジダ・クルセイ(*Candida krusei*)、カンジダ・パラプシロシス(*Candida parapsilosis*)、カンジダ・ギリエルモンディ(*Candida guilliermondii*)、カンジダ・ヴィスワナーティ(*Candida viswanathii*)、カンジダ・ルシタニアエ(*Candida lusitaniae*)、ロドトルラ・ムチラギノーザ(*Rhodotorula mucilaginosa*)、ピキア・メタノリカ(*Pichia metanolica*)、ピキア・アングスタ(*Pichia angusta*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、ピキア・アノマラ(*Pichia anomala*)、ハンゼヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)、クライベロマイセス・ラクティス(*Kluyveromyces lactis*)、チゴサッカロマイセス・ロウキシ(*Zygosaccharomyces rouxii*)、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)、トリコスポロン・プルランス(*Trichosporon pullulans*)、ロドスポリジウム・トルーアスペルギルス・ニガー(*Rhodosporidium torulae Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニジュランス(*Aspergillus nidulans*)、アスペルギルス・アワモリ(*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・リーセイ(*Trichoderma reesei*)、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)、ブレタノマイセス・ブルセレンシス(*Brettanomyces bruxellensis*)、カンジダ・ステラータ(*Candida stellata*)、分裂酵母、*Torulaspora delbrueckii*、*Zygosaccharomyces bailii*、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、クリプトコッカス・ガッティ(*Cryptococcus gattii*)、またはサッカロマイセス・ブラウディ(*Saccharomyces boulardii*)を含む。

【0276】

例示的な酵母宿主細胞は、限定されないが、GS115、KM71H、SMD1168、SMD1168H、およびX-33などのピキア・パストリス酵母菌株；INVSc1

10

20

30

40

50

などのサッカロミセス・セレビシエ酵母菌株を含む。

【0277】

いくつかの実施態様では、追加の動物細胞は、軟体動物、節足動物、環形動物、または海綿動物から得られる細胞を含む。いくつかの実施態様では、追加の動物細胞は、例えば、霊長類、類人猿、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、またはげっ歯類に由来する哺乳動物細胞である。場合によっては、げっ歯類は、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、ハムスター、チンチラ、ファンシーラット、またはモルモットを含む。

【0278】

例示的な哺乳動物宿主細胞としては、限定されないが、293A細胞株、293FT細胞株、293F細胞、293H細胞、CHO DG44細胞、CHO-S細胞、CHO-K1細胞、FUT8 KO CHOK1、Exp i 293 F (商標) 細胞、Flp-In (商標) T-REx (商標) 293細胞株、Flp-In (商標) -293細胞株、Flp-In (商標) -3T3細胞株、Flp-In (商標) -BHK細胞株、Flp-In (商標) -CHO細胞株、Flp-In (商標) -CV-1細胞株、Flp-In (商標) -Jurkat細胞株、FreeStyle (商標) 293-F細胞、FreeStyle (商標) CHO-S細胞、GripTite (商標) 293 MSR細胞株、GS-CHO細胞株、HepaRG (商標) 細胞、T-REx (商標) Jurkat細胞株、Per.C6細胞、T-REx (商標) -293細胞株、T-REx (商標) -CHO細胞株、およびT-REx (商標) -HeLa細胞株が挙げられる。

【0279】

いくつかの例では、哺乳動物宿主細胞は、安定した細胞株であるか、または関心対象の遺伝物質をそれ自体のゲノムに組み込み、細胞分裂の多くの世代後に遺伝物質の生成物を発現する能力を有する細胞株である。場合によっては、哺乳動物宿主細胞は、一過性の細胞株であるか、または対象の遺伝物質をそれ自体のゲノムに組み込んでおらず、細胞分裂の多くの世代後に遺伝物質の生成物を発現する能力を有していない細胞株である。

【0280】

例示的な昆虫宿主細胞としては、限定されないが、ショウジョウバエS2細胞、Sf9細胞、Sf21細胞、High Five (商標) 細胞、およびexpressF+ (登録商標) 細胞が挙げられる。

【0281】

いくつかの例では、植物細胞は藻類からの細胞を含む。例示的な昆虫細胞株としては、限定されないが、コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 137cまたはシネココッカス (*Synechococcus elongatus*) PPC 7942からの株が挙げられる。

【0282】

製品

本発明の他の態様では、上記の障害の処置、予防、および／または診断に役立つ材料を含む製品が提供される。製品は、容器、および容器上のまたは容器に付属のラベルまたは添付文書を含む。適切な容器は例えば、瓶、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどを含む。容器はガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されてもよい。容器は、疾病を処置、予防、および／または診断するのに有効な組成物を、単独でまたは別の組成物と組み合わせて保持し、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能な栓を有する静脈用注射液バッグまたはバイアルであってもよい）。組成物中の少なくとも1つの活性薬剤は、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合部位、および本明細書中で先に定義されたEGFRに特異的に結合する第2の抗原結合部位を含む二重特異性抗体である。

【0283】

ラベルまたは添付文書は、選択された状態を処置するために組成物が使用されることを示している。さらに、製品は、(a) 内部に組成物が入れた第1の容器であって、組成物は本発明の二重特異性抗体を含む、第1の容器と；(b) 内部に組成物が入れた

10

20

30

40

50

第2の容器であって、組成物はさらに細胞毒性剤またはそうでなければ治療剤を含む、第2の容器とを含み得る。本発明のこの実施形態における製品は、特定の状態を処置するために上記組成物を使用することができるということを示す添付文書をさらに含み得る。

【0284】

代替的にまたは追加的に、製品はさらに、注射用の静菌性の水（B W F I）、リン酸緩衝食塩水、リンゲル溶液、およびデキストロース溶液などの薬学的に許容可能な緩衝液を含む、第2の（または第3の）容器を含んでもよい。それはさらに、他の緩衝剤、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジを含む、商業的かつユーザー寄りの観点から望ましい他の材料を含んでいる。

【0285】

特定の定義

本明細書で使用される用語は、特定の事例のみを記載することを目的としており、本発明を限定することを意図していない。本明細書で使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が他に明白に示していない限り、複数形を同様に含むことが意図されている。さらに、「含むこと（including）」、「含む（includes）」、「有すること（having）」、「有する（has）」、「とともに（with）」という用語またはその変形が、詳細な記載および／または請求項のいずれかで使用される程度まで、そのような用語は、「含む（comprising）」という用語に類似した方法で含まれるように意図されている。

【0286】

「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、完全に組み立てられた抗体、抗原を結合することができる抗体フラグメント、例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、一本鎖抗体（scFv）、ダイアボディ、抗体キメラ、ハイブリッド抗体、二重特異性抗体などを包含する。

【0287】

「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、抗体が結合するエピトープに対して構造が相補的であり、可変領域の残りよりも可変度が高い抗体の可変領域のセグメントである。これに応じて、CDRはしばしば超可変領域と呼ばれる。可変領域は3つのCDRを含む。CDRペプチドは関心対象の抗体のCDRをコードする遺伝子の構築により得ることができる。そのような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAからの可変領域を合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を使用することにより、調製される。例えば、Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), pages 166-179 (Cambridge University Press 1995); および Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), pages 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995) を参照されたい。

【0288】

「Fab」という用語は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）を含むタンパク質を指す。Fabフラグメントは、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に少数の残基を加えることでFab'フラグメントとは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有しているFab'に関する本明細書での命名である。Fab'フラグメントは、F(ab')₂フラグメントの重鎖ジスルフィド架橋の還元により生成される。抗体フラ

10

20

30

40

50

グメントの他の化学的カップリングも知られている。

【0289】

「単鎖可変フラグメント (s c F v)」とは、10～約25個のアミノ酸の短いリンカーペプチドと接続した、抗体の重鎖 (V H) と軽鎖 (V L) の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは通常、柔軟性のためにグリシンが豊富であり、溶解性のためにセリンまたはスレオニンが豊富であり、V H の N 末端を V L の C 末端に接続するか、またはその逆を接続することができる。このタンパク質は、定常領域を取り除いてリンカーを導入したにもかかわらず、元の抗体の特異性を保持している。s c F v 抗体は、例えば、Houston, J. S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96 に記載されるものである。加えて、抗体フラグメントは単鎖ポリペプチドを含み、単鎖ポリペプチドは、V H ドメインの特徴を有する、すなわち、V L ドメインとともに組み立てることができる、または V L ドメインの特徴を有する、すなわち、V H ドメインとともに機能的な抗原結合部位に組み立てることができ、それによって完全長の抗体の抗原結合特性を提供する。

10

【0290】

本開示の好ましい実施形態が本明細書中で示され、記載されてきたが、このような実施形態はほんの一例として提供されているに過ぎないということは、当業者に明らかであろう。

多くの変形、変更、および置き換えは、本開示から逸脱することなく、当業者によって想到されるものである。本明細書に記載される本開示の実施形態の様々な代案が、本開示の実施に際して利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を定義するものであり、ならびに、この特許請求の範囲およびその同等物の範囲内の方法および構造はそれによって包含されることが意図されている。

20

【発明を実施するための形態】

【0291】

実施形態 1 は、式 I である $A_2 - A_1 - L_1 - P_1 - H_1$ に記載される単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 A_1 は、エフェクター細胞抗原に結合する第 1 の抗原認識分子を含み、 P_1 は、 A_1 に結合するペプチドを含み、 L_1 は、 A_1 を P_1 に接続し、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含み、 H_1 は半減期延長分子を含み、および A_2 は、上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合する第 2 の抗原認識分子を含む。

30

【0292】

実施形態 2 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、第 1 の抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む。

【0293】

実施形態 3 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、第 1 の抗原認識分子は、ヒト抗体またはヒト化抗体または抗体フラグメントを含む。

【0294】

実施形態 4 は、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、第 1 の抗原認識分子の N 末端に結合される。

40

【0295】

実施形態 5 は、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 A_2 は、第 1 の抗原認識分子の C 末端に結合される。

【0296】

実施形態 6 は、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、第 1 の抗原認識分子の C 末端に結合される。

【0297】

実施形態 7 は、実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 A_2 は、第 1 の抗原認識分子の N 末端に結合される。

50

【0298】

実施形態8は、実施形態2～7のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、またはFabフラグメントを含む。

【0299】

実施形態9は、実施形態8に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₁は、単鎖可変フラグメント（scFv）である。

【0300】

実施形態10は、実施形態9に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、scFvは、scFv重鎖ポリペプチドおよびscFv軽鎖ポリペプチドを含む。

10

【0301】

実施形態11は、実施形態8に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₁は、シングルドメイン抗体である。

【0302】

実施形態12は、実施形態8に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント（scFv）、重鎖可変ドメイン（VHドメイン）、軽鎖可変ドメイン（VLドメイン）、またはラクダ科動物由来のシングルドメイン抗体の可変ドメイン（VHH）を含む。

20

【0303】

実施形態13は、実施形態1～12のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₁は、抗CD3e単鎖可変フラグメントを含む。

【0304】

実施形態14は、実施形態1～12のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₁は、CD3発現細胞上でCD3への1μM以下のKD結合を有する抗CD3e単鎖可変フラグメントを含む。

【0305】

実施形態15は、実施形態1～14のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞抗原は、CD3を含む。

【0306】

実施形態16は、実施形態1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₁は、それぞれがヒトCD3に特異的に結合することができる可変軽鎖および可変重鎖を含む。

30

【0307】

実施形態17は、実施形態1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₁は、ムロモナブ-CD3（OKT3）、オテリキシズマブ（TRX4）、テブリズマブ（MGA031）、ビジリズマブ（Nuvion）、SP34、X35、VIT3、BMA030（BW264/56）、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16、および15865v19からなる群から選択される相補性決定領域（CDR）を含む。

40

【0308】

実施形態18は、実施形態1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、式Iに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、L₁が腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断されるとエフェクター細胞抗原に結合する。

【0309】

実施形態19は、実施形態1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合

50

体を含み、式 I に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 が腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断され、かつ A_1 がエフェクター細胞に結合するとエフェクター細胞に結合する。

【0310】

実施形態 20 は、実施形態 19 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞は、T 細胞である。

【0311】

実施形態 21 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 A_1 は、エフェクター細胞上で TCR-CD3 複合体の一部であるポリペプチドに結合する。

【0312】

実施形態 22 は、実施形態 21 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、TCR-CD3 複合体の一部であるポリペプチドは、ヒト CD3 ϵ である。

【0313】

実施形態 23 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、scFv は、CDR である LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 を含み、scFv の LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 は、配列番号 1 の LC-CDR1、配列番号 2 の LC-CDR2、および配列番号 3 の LC-CDR3 を含み、かつ scFv は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、scFv の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号 4 の HC-CDR1、配列番号 5 の HC-CDR2、および配列番号 6 の HC-CDR3 を含む。

【0314】

実施形態 24 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、 A_1 は、CDR である LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 を含み、 A_1 の LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 は、配列番号 1 の LC-CDR1、配列番号 2 の LC-CDR2、および配列番号 3 の LC-CDR3 を含み、かつ A_1 は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、 A_1 の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号 4 の HC-CDR1、配列番号 5 の HC-CDR2、および配列番号 6 の HC-CDR3 を含む。

【0315】

実施形態 25 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、scFv は、配列番号 13 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0316】

実施形態 26 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、scFv は、CDR である LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 を含み、scFv の LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 は、配列番号 7 の LC-CDR1、配列番号 8 の LC-CDR2、および配列番号 9 の LC-CDR3 を含み、かつ scFv は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、scFv の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号 10 の HC-CDR1、配列番号 11 の HC-CDR2、および配列番号 12 の HC-CDR3 を含む。

【0317】

実施形態 27 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞抗原は CD3 を含み、 A_1 は、CDR である LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 を含み、scFv の LC-CDR1、LC-CDR2、および LC-CDR3 は、配列番号 7 の LC-CDR1、配列番号 8 の LC-CDR2、および LC-CDR3 を含む。

D R 2、および配列番号 9 の L C - C D R 3 を含み、かつ A₁ は、相補性決定領域 (C D R) である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、A₁ の H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 は、配列番号 10 の H C - C D R 1、配列番号 11 の H C - C D R 2、および配列番号 12 の H C - C D R 3 を含む。

【0318】

実施形態 28 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞抗原は、C D 3 を含み、s c F v は、配列番号 14 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0319】

実施形態 29 は、実施形態 1 ~ 28 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、第 2 の抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む。

10

【0320】

実施形態 30 は、実施形態 29 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体またはその抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、または F a b を含む。

【0321】

実施形態 31 は、実施形態 29 の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体またはその抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント (s c F v)、重鎖可変ドメイン (V H ドメイン)、軽鎖可変ドメイン (V L ドメイン)、またはラクダ科動物由来のシングルドメイン抗体の可変ドメイン (V H H) を含む。

20

【0322】

実施形態 32 は、実施形態 29 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体またはその抗体フラグメントは、ヒト化されているかヒトである。

【0323】

実施形態 33 は、実施形態 30 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ は、F a b である。

【0324】

実施形態 34 は、実施形態 33 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、F a b は、(a) F a b 軽鎖ポリペプチドおよび (b) F a b 重鎖ポリペプチドを含む。

30

【0325】

実施形態 35 は、実施形態 33 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、F a b は、C D R である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、F a b の L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 は、配列番号 15 の L C - C D R 1、配列番号 16 の L C - C D R 2、および配列番号 17 の L C - C D R 3 を含み、かつ F a b は、相補性決定領域 (C D R) である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、F a b の H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 は、配列番号 18 の H C - C D R 1、配列番号 19 の H C - C D R 2、および配列番号 20 の H C - C D R 3 を含む。

40

【0326】

実施形態 36 は、実施形態 29 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ は、C D R である L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 を含み、A₂ の L C - C D R 1、L C - C D R 2、および L C - C D R 3 は、配列番号 15 の L C - C D R 1、配列番号 16 の L C - C D R 2、および配列番号 17 の L C - C D R 3 を含み、かつ A₂ は、相補性決定領域 (C D R) である H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 を含み、A₂ の H C - C D R 1、H C - C D R 2、および H C - C D R 3 は、配列番号 18 の H C - C D R 1、配列番号 19 の H C - C D R 2、および配列番号 20 の H C - C D R 3 を含む。

【0327】

50

実施形態 37 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、F a b 軽鎖ポリペプチドは、配列番号 21 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0328】

実施形態 38 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、F a b 軽鎖ポリペプチドは、配列番号 22 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0329】

実施形態 39 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、F a b 重鎖ポリペプチドは、配列番号 23 に記載されるアミノ酸配列を含む。

10

【0330】

実施形態 40 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、F a b 重鎖ポリペプチドは、配列番号 24 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0331】

実施形態 41 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ の F a b 軽鎖ポリペプチドは、A₁ の単鎖可変フラグメント (s c F v) の C 末端に結合される。

【0332】

実施形態 42 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ の F a b 重鎖ポリペプチドは、A₁ の単鎖可変フラグメント (s c F v) の C 末端に結合される。

20

【0333】

実施形態 43 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ の F a b 軽鎖ポリペプチドは、A₁ の単鎖可変フラグメント (s c F v) の N 末端に結合される。

【0334】

実施形態 44 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ の F a b 重鎖ポリペプチドは、A₁ の単鎖可変フラグメント (s c F v) の N 末端に結合される。

30

【0335】

実施形態 45 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ の F a b 重鎖ポリペプチドは、A₁ の s c F v 重鎖ポリペプチドに結合される。

【0336】

実施形態 46 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ の F a b 軽鎖ポリペプチドは、A₁ の s c F v 重鎖ポリペプチドに結合される。

【0337】

実施形態 47 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ の F a b 重鎖ポリペプチドは、A₁ の s c F v 軽鎖ポリペプチドに結合される。

40

【0338】

実施形態 48 は、実施形態 34 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ の F a b 軽鎖ポリペプチドは、A₁ の s c F v 軽鎖ポリペプチドに結合される。

【0339】

実施形態 49 は、実施形態 1～48 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、A₂ は、P₂ および L₂ をさらに含み、P₂ は、A₂ に

50

結合するペプチドを含み、ならびに L_2 は、 A_2 を P_2 に接続し、かつ腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む。

【0340】

実施形態50は、実施形態49に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、式Iaである $P_2-L_2-A_2-A_1-L_1-P_1-H_1$ に記載される。

【0341】

実施形態51は、実施形態50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 A_2 の Fab 重鎖ポリペプチドは、 A_1 の scFv 重鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 の Fab 軽鎖ポリペプチドに結合される。

10

【0342】

実施形態52は、実施形態50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 A_2 の Fab 軽鎖ポリペプチドは、 A_1 の scFv 重鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 の Fab 重鎖ポリペプチドに結合される。

【0343】

実施形態53は、実施形態50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 A_2 の Fab 重鎖ポリペプチドは、 A_1 の scFv 軽鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 の Fab 軽鎖ポリペプチドに結合される。

【0344】

実施形態54は、実施形態50に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 A_2 の Fab 軽鎖ポリペプチドは、 A_1 の scFv 軽鎖ポリペプチドに結合され、かつ L_2 は、 A_2 の Fab 重鎖ポリペプチドに結合される。

20

【0345】

実施形態55は、実施形態1～54のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、エフェクター細胞抗原への A_1 の結合を損なわせる。

【0346】

実施形態56は、実施形態1～55のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、イオン間相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π スタッキング相互作用、および水素結合相互作用、またはこれらの組合せによって、 A_1 に結合される。

30

【0347】

実施形態57は、実施形態1～56のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、エフェクター細胞抗原に対して70%未満の配列相同性を有する。

【0348】

実施形態58は、実施形態49～57のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_2 は、EGFR への A_2 の結合を損なわせる。

【0349】

実施形態59は、実施形態49～58のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_2 は、イオン間相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π スタッキング相互作用、および水素結合相互作用、またはこれらの組合せによって、 A_2 に結合される。

40

【0350】

実施形態60は、実施形態49～59のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_2 は、抗原結合部位で、またはその近くで A_2 に結合される。

【0351】

実施形態61は、実施形態49～60のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_2 は、EGFR に対して70%未満の配列相同性を

50

有する。

【0352】

実施形態62は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁またはP₂は、少なくとも10アミノ酸長のペプチド配列を含む。

【0353】

実施形態63は、実施形態1～62のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁またはP₂は、少なくとも10アミノ酸長かつ20アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。

【0354】

実施形態64は、実施形態1～63のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁またはP₂は、少なくとも16アミノ酸長のペプチド配列を含む。

【0355】

実施形態65は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁またはP₂は、40アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。

【0356】

実施形態66は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁またはP₂は、少なくとも2つのシステインアミノ酸残基を含む。

【0357】

実施形態67は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁またはP₂は、環状ペプチドまたは線状ペプチドを含む。

【0358】

実施形態68は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁またはP₂は、環状ペプチドを含む。

【0359】

実施形態69は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁またはP₂は、線状ペプチドを含む。

【0360】

実施形態70は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁は、少なくとも2つのシステインアミノ酸残基を含む。

【0361】

実施形態71は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁は、配列番号25に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0362】

実施形態72は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号26に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0363】

実施形態73は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁は、配列番号70に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0364】

実施形態74は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号26、71～96、98～776のい

10

20

30

40

50

いずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号26、71～96、98～776のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0365】

実施形態75は、実施形態1～61のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、X₁－C－X₂－X₃－X₄－X₅－D－X₆－A－X₇－P－X₈－C－X₉に記載されるアミノ酸配列を含み、X₁はPおよびLから選択され、X₂はR、L、T、A、N、I、V、S、H、およびPから選択され、X₃はS、P、F、およびYから選択され、X₄はH、L、Q、P、R、F、Nから選択され、X₅はI、F、Y、H、N、T、S、D、A、L、およびVから選択され、X₆はT、P、N、L、I、V、S、D、H、A、およびYから選択され、X₇はKおよびYから選択され、X₈はI、P、L、およびMから選択され、ならびにX₉はA、V、I、T、L、S、D、F、V、およびH（配列番号841）から選択される。

10

【0366】

実施形態76は、実施形態75に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、X₁はPおよびLから選択され、X₂はR、L、T、A、およびNから選択され、X₃はS、P、およびFから選択され、X₄はH、L、Q、およびPから選択され、X₅はI、F、Y、H、N、およびTから選択され、X₆はT、P、N、L、I、およびVから選択され、X₇はKであり、X₈はIであり、ならびにX₉はA、V、I、T、L、およびSから選択される。

20

【0367】

実施形態77は、実施形態76に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、X₁はPであり、X₂はR、L、およびTから選択され、X₃はSであり、X₄はH、L、Q、およびPから選択され、X₅はI、F、Y、およびTから選択され、X₆はT、P、N、およびVから選択され、X₇はKであり、ならびにX₈はIであり、ならびにX₉はA、V、およびIから選択される。

【0368】

実施形態78は、実施形態1～77のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号26、86～96のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号26、86～96のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0369】

実施形態79は、実施形態78に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号26、86～96のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0370】

実施形態80は、実施形態1～77のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号98～776のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0371】

実施形態81は、実施形態80に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号98～776のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0372】

実施形態82は、実施形態1～77のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号99～118のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号99～118のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

50

【0373】

実施形態83は、実施形態82に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号99～118のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0374】

実施形態84は、実施形態1～77のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号26に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号26に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0375】

実施形態85は、実施形態84に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₂は、配列番号26に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0376】

実施形態86は、実施形態1～85のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁は、配列番号25、797から835、もしくは843から1690のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号25、797から835、もしくは843から1690のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0377】

実施形態87は、実施形態1～85のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P₁は、Z₁－Z₂－C－Z₄－P－Z₆－Z₇－Z₈－Z₉－Z₁₀－Z₁₁－Z₁₂－C－Z₁₄に記載されるアミノ酸配列を含み、Z₁はD、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、およびPから選択され、Z₂はD、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、およびSから選択され、Z₄はGおよびWから選択され、Z₆はE、D、V、およびPから選択され、Z₇はW、L、F、V、G、M、I、およびYから選択され、Z₈はE、D、P、およびQから選択され、Z₉はE、D、Y、V、F、W、P、L、およびQから選択され、Z₁₀はS、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、およびHから選択され、Z₁₁はI、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、およびHから選択され、Z₁₂はF、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、およびHから選択され、ならびにZ₁₄はD、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、およびSから選択される。

【0378】

実施形態88は、実施形態87に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、Z₁はD、Y、F、I、およびNから選択され、Z₂はD、Y、L、F、I、およびNから選択され、Z₄はGおよびWから選択され、Z₆はEおよびDから選択され、Z₇はW、L、F、およびVから選択され、Z₈はEおよびDから選択され、Z₉はE、D、Y、およびVから選択され、Z₁₀はS、D、Y、T、およびIから選択され、Z₁₁はI、Y、F、V、L、およびTから選択され、Z₁₂はF、D、Y、L、I、V、A、およびNから選択され、ならびにZ₁₄はD、Y、N、F、I、およびPから選択される。

【0379】

実施形態89は、実施形態88に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、Z₁はD、Y、およびFから選択され、Z₂はD、Y、L、およびFから選択され、Z₄はGおよびWから選択され、Z₆はEおよびDから選択され、Z₇はW、L、およびFから選択され、Z₈はEおよびDから選択され、Z₉はEおよびDから選択され、Z₁₀はS、D、およびYから選択され、Z₁₁はI、Y、およびFから選択され、Z₁₂はF、D、Y、およびLから選択され、ならびにZ₁₄はD、Y、およびNから選択される。

【0380】

実施形態90は、実施形態1～85のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドま

10

20

30

40

50

たはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は $U_1-U_2-C-U_4-P-U_6-U_7-U_8-U_9-U_{10}-U_{11}-U_{12}-C-U_{14}$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 U_1 はD、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、およびPから選択され、 U_2 はD、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、およびSから選択され、 U_4 はGおよびWから選択され、 U_6 はE、D、V、およびPから選択され、 U_7 はW、L、F、V、G、M、I、およびYから選択され、 U_8 はE、D、P、およびQから選択され、 U_9 はE、D、Y、V、F、W、P、L、およびQから選択され、 U_{10} はS、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、およびHから選択され、 U_{11} はI、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、およびHから選択され、 U_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、G、およびHから選択され、ならびに U_{14} はD、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、M、およびSから選択される。

10

【0381】

実施形態91は、実施形態90に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 U_1 はD、Y、F、I、V、およびNから選択され、 U_2 はD、Y、L、F、I、およびNから選択され、 U_4 はGおよびWから選択され、 U_6 はEおよびDから選択され、 U_7 はW、L、F、G、およびVから選択され、 U_8 はEおよびDから選択され、 U_9 はE、D、Y、およびVから選択され、 U_{10} はS、D、Y、T、およびIから選択され、 U_{11} はI、Y、F、V、L、およびTから選択され、 U_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、G、およびNから選択され、および U_{14} はD、Y、N、F、I、M、およびPから選択される。

20

【0382】

実施形態92は、実施形態91に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 U_1 はD、Y、V、およびFから選択され、 U_2 はD、Y、L、およびFから選択され、 U_4 はGおよびWから選択され、 U_6 はEおよびDから選択され、 U_7 はW、L、G、およびFから選択され、 U_8 はEおよびDから選択され、 U_9 はEおよびDから選択され、 U_{10} はS、D、T、およびYから選択され、 U_{11} はI、Y、V、L、およびFから選択され、 U_{12} はF、D、Y、G、A、およびLから選択され、ならびに U_{14} はD、Y、M、およびNから選択される。

【0383】

実施形態93は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号797～823のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

30

【0384】

実施形態94は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号25、824～835、または843～1690のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0385】

実施形態95は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号824～835のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

40

【0386】

実施形態96は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号810のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0387】

実施形態97は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号811のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

50

【0388】

実施形態98は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号834のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0389】

実施形態99は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0390】

実施形態100は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0391】

実施形態101は、実施形態1～92のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0392】

実施形態102は、実施形態1～101のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、 A_1 のN末端に結合される。

【0393】

実施形態103は、実施形態1～101のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、 A_1 のC末端に結合される。

【0394】

実施形態104は、実施形態49～101のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_2 は、 A_2 のN末端に結合される。

【0395】

実施形態105は、実施形態49～101のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_2 は、 A_2 のC末端に結合される。

【0396】

実施形態106は、実施形態1～105のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、少なくとも5～50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0397】

実施形態107は、実施形態1～105のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、少なくとも10～30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0398】

実施形態108は、実施形態1～105のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、少なくとも10のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0399】

実施形態109は、実施形態1～105のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、少なくとも18のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0400】

実施形態110は、実施形態1～105のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、少なくとも26のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0401】

10

20

30

40

50

実施形態 111 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、 $(G_2S)_n$ を含む式を有し、式中、 n は、1 から 3 の整数（配列番号 840）である。

【0402】

実施形態 112 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ （配列番号 836）、 $(GGGS)_n$ （配列番号 837）、 $(GGGGS)_n$ （配列番号 838）、および $(GSSGGS)_n$ （配列番号 839）からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも 1 の整数である。

【0403】

実施形態 113 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_1 は、 L_1 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A_1 から結合解除され、それによって A_1 をエフェクター細胞抗原に晒す。

【0404】

実施形態 114 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_2 は、 L_2 が腫瘍特異的プロテアーゼによって切断されると A_2 から結合解除され、それによって A_2 を EGFR に晒す。

【0405】

実施形態 115 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、腫瘍特異的プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、およびアスパラギン酸プロテアーゼからなる群から選択される。

【0406】

実施形態 116 は、実施形態 115 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、または MMP14 を含む。

【0407】

実施形態 117 は、実施形態 115 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ（MTSP1）、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。

【0408】

実施形態 118 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、ウロキナーゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリプターゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリックスメタロプロテアーゼで切断可能なアミノ酸配列、またはレグマインで切断可能なアミノ酸配列を含む。

【0409】

実施形態 119 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、配列番号 30 または 31 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0410】

実施形態 120 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、配列番号 27～35 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0411】

実施形態 121 は、実施形態 1～105 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、リンカー 4（ISSGLLSGRSDAG）（配列番号 66）、リンカー 5（AAGLLAPPGLSGRSDAG）（配列番号 67）、リンカー 6（SPLGLSGRSDAG）（配列番号 68）、もしくはリンカー 7（LSGRSDAGSPLGLAG）（配列番号 69）のアミノ酸配列、または、リンカー 4、リンカー 5、リンカー 6、もしくはリンカー 7 のアミノ酸配列に対し

10

20

30

40

50

て1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0412】

実施形態122は、実施形態1～121のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、H₁は、ポリマーを含む。

【0413】

実施形態123は、実施形態1～121のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である。

【0414】

実施形態124は、実施形態1～121のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、H₁は、アルブミンを含む。

【0415】

実施形態125は、実施形態1～121のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、H₁は、Fcドメインを含む。

【0416】

実施形態126は、実施形態124に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、アルブミンは、血清アルブミンである。

【0417】

実施形態127は、実施形態124に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。

【0418】

実施形態128は、実施形態1～121のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、H₁は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む。

【0419】

実施形態129は、実施形態128に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリペプチド、リガンド、または小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、またはCD35／CR1を結合する。

【0420】

実施形態130は、実施形態129に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスチレチン、1-酸性糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む。

【0421】

実施形態131は、実施形態129に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM、またはIgDを含む。

【0422】

実施形態132は、実施形態129に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、血清タンパク質は、アルブミンである。

【0423】

実施形態133は、実施形態128に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリペプチドは、抗体である。

【0424】

実施形態134は、実施形態133に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体は、シングルドメイン抗体、単鎖可変フラグメント、またはFabを含む。

【0425】

10

20

30

40

50

実施形態 135 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、アルブミンに結合するシングルドメイン抗体を含む。

【0426】

実施形態 136 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。

【0427】

実施形態 137 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、645 g H 1 g L 1 である。

【0428】

実施形態 138 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、645 d s g H 5 g L 4 である。

【0429】

実施形態 139 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、23-13-A01-sc02 である。

【0430】

実施形態 140 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、A10m3 またはそのフラグメントである。

【0431】

実施形態 141 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、DOM7r-31 である。

【0432】

実施形態 142 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、DOM7h-11-15 である。

【0433】

実施形態 143 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、Alb-1、Alb-8、または Alb-23 である。

【0434】

実施形態 144 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、10E である。

【0435】

実施形態 145 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、シングルドメイン抗体の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号 36 の HC-CDR1、配列番号 37 の HC-CDR2、および配列番号 38 の HC-CDR3 を含む。

【0436】

実施形態 146 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、シングルドメイン抗体の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号 39 の HC-CDR1、配列番号 40 の HC-CDR2、および配列番号 41 の HC-CDR3 を含む。

【0437】

実施形態 147 は、実施形態 134 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、SA21 である。

【0438】

実施形態 148 は、実施形態 1~147 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、修飾されたアミノ酸、非天然アミノ酸、修飾された非天然アミノ酸、またはこれらの

10

20

30

40

50

組合せを含む。

【0439】

実施形態149は、実施形態148に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、修飾されたアミノ酸または修飾された非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。

【0440】

実施形態150は、実施形態1～149のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 H_1 は、 H_1 を P_1 に接続する連結部分(L_3)を含む。

【0441】

実施形態151は、実施形態150に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_3 は、少なくとも5～50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0442】

実施形態152は、実施形態150に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_3 は、少なくとも10～30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0443】

実施形態153は、実施形態150に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_3 は、少なくとも10のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0444】

実施形態154は、実施形態150に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_3 は、少なくとも18のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0445】

実施形態155は、実施形態150に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_3 は、少なくとも26のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0446】

実施形態156は、実施形態150に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_3 は、 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (配列番号836)、 $(GGGS)_n$ (配列番号837)、 $(GGGG)_n$ (配列番号838)、および $(GSSGGS)_n$ (配列番号839)からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも1の整数である。

【0447】

実施形態157は、実施形態150に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_3 は、配列番号29に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0448】

実施形態158は、実施形態1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号44～61のいずれか1つに対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0449】

実施形態159は、実施形態1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号50に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0450】

実施形態160は、実施形態1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号51に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0451】

実施形態161は、実施形態1に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号44および

10

20

30

40

50

配列番号 45 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0452】

実施形態 162 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 46 および配列番号 47 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0453】

実施形態 163 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 48 および配列番号 49 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0454】

実施形態 164 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 50 および配列番号 51 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0455】

実施形態 165 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 52 および配列番号 53 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0456】

実施形態 166 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 54 および配列番号 55 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0457】

実施形態 167 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 56 および配列番号 57 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0458】

実施形態 168 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 58 および配列番号 59 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0459】

実施形態 169 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 60 および配列番号 61 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0460】

実施形態 170 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 62 および配列番号 63 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0461】

実施形態 171 は、実施形態 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 64 および配列番号 65 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0462】

実施形態 172 は、(a) 実施形態 1 ~ 171 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体および (b) 薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物を含む。

【0463】

実施形態 173 は、実施形態 1 ~ 171 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする単離された組換え核酸分子を含む。

【0464】

実施形態 174 は、式 I I である $L_{1a}-P_{1a}-H_{1a}$ に記載される単離されたポリ

10

20

30

40

50

ペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、式中、 L_{1a} は、未切断のとき P_{1a} をエフェクター細胞抗原に結合する第1の抗原認識分子に接続する腫瘍特異的プロテアーゼによって切断された連結部分を含み、かつ第1の抗原認識分子は、EGFRに結合する第2の抗原認識分子に結合され、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のとき第1の抗原認識分子に結合するペプチドを含み、および、 H_{1a} は、半減期延長分子を含む。

【0465】

実施形態175は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、 L_{1a} が未切断のときエフェクター細胞抗原への第1の抗原認識分子の結合を損なわせる。

【0466】

実施形態176は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、第1の抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントを含む。

【0467】

実施形態177は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、エフェクター細胞抗原は、抗CD3エフェクター細胞抗原である。

【0468】

実施形態178は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、エフェクター細胞抗原に対して70%未満の配列相同性を有する。

【0469】

実施形態179は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、少なくとも10アミノ酸長のペプチド配列を含む。

【0470】

実施形態180は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、少なくとも10アミノ酸長かつ20アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。

【0471】

実施形態181は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、少なくとも16アミノ酸長のペプチド配列を含む。

【0472】

実施形態182は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、40アミノ酸長以下のペプチド配列を含む。

【0473】

実施形態183は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、少なくとも2つのシステインアミノ酸残基を含む。

【0474】

実施形態184は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、環状ペプチドまたは線状ペプチドを含む。

【0475】

実施形態185は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、環状ペプチドを含む。

【0476】

実施形態186は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、線状ペプチドを含む。

【0477】

実施形態187は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、配列番号25からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0478】

実施形態188は、実施形態174に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチ

10

20

30

40

50

ド複合体を含み、 P_{1a} は、配列番号70に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0479】

実施形態189は、実施形態174～187のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 H_{1a} は、ポリマーを含む。

【0480】

実施形態190は、実施形態189に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG）である。

【0481】

実施形態191は、実施形態174～190のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、配列番号25、797～835、もしくは843～1690のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列、または、配列番号25、797～835、もしくは843～1690のいずれか1つに対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0482】

実施形態192は、実施形態174～190のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は、 $Z_1-Z_2-C-Z_4-P-Z_6-Z_7-Z_8-Z_9-Z_{10}-Z_{11}-Z_{12}-C-Z_{14}$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 Z_1 はD、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、およびPから選択され、 Z_2 はD、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、およびSから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はE、D、V、およびPから選択され、 Z_7 はW、L、F、V、G、M、I、およびYから選択され、 Z_8 はE、D、P、およびQから選択され、 Z_9 はE、D、Y、V、F、W、P、L、およびQから選択され、 Z_{10} はS、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、およびHから選択され、 Z_{11} はI、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、およびHから選択され、 Z_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、およびHから選択され、ならびに Z_{14} はD、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、およびSから選択される。

【0483】

実施形態193は、実施形態192に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 Z_1 はD、Y、F、I、およびNから選択され、 Z_2 はD、Y、L、F、I、およびNから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はEおよびDから選択され、 Z_7 はW、L、F、およびVから選択され、 Z_8 はEおよびDから選択され、 Z_9 はE、D、Y、およびVから選択され、 Z_{10} はS、D、Y、T、およびIから選択され、 Z_{11} はI、Y、F、V、L、およびTから選択され、 Z_{12} はF、D、Y、L、I、V、A、およびNから選択され、ならびに Z_{14} はD、Y、N、F、I、およびPから選択される。

【0484】

実施形態194は、実施形態193に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 Z_1 はD、Y、およびFから選択され、 Z_2 はD、Y、L、およびFから選択され、 Z_4 はGおよびWから選択され、 Z_6 はEおよびDから選択され、 Z_7 はW、L、およびFから選択され、 Z_8 はEおよびDから選択され、 Z_9 はEおよびDから選択され、 Z_{10} はS、D、およびYから選択され、 Z_{11} はI、Y、およびFから選択され、 Z_{12} はF、D、Y、およびLから選択され、ならびに Z_{14} はD、Y、およびNから選択される。

【0485】

実施形態195は、実施形態174～190のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 P_{1a} は $U_1-U_2-C-U_4-P-U_6-U_7-U_8-U_9-U_{10}-U_{11}-U_{12}-C-U_{14}$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 U_1 はD、Y、F、I、N、V、H、L、A、T、S、およびPから選択され、 U_2 はD、Y、L、F、I、N、A、V、H、T、およびSから選択され、 U_4 はGおよびWから選択され、 U_6 はE、D、V、およびPから選択され、 U_7 はW、L、F、V、G、M、I

10

20

30

40

50

、および Y から選択され、U₈ は E、D、P、および Q から選択され、U₉ は E、D、Y、V、F、W、P、L、および Q から選択され、U₁₀ は S、D、Y、T、I、F、V、N、A、P、L、および H から選択され、U₁₁ は I、Y、F、V、L、T、N、S、D、A、および H から選択され、U₁₂ は F、D、Y、L、I、V、A、N、T、P、S、G、および H から選択され、ならびに U₁₄ は D、Y、N、F、I、P、V、A、T、H、L、M、および S から選択される。

【0486】

実施形態 196 は、実施形態 195 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、U₁ は D、Y、F、I、V、および N から選択され、U₂ は D、Y、L、F、I、および N から選択され、U₄ は G および W から選択され、U₆ は E および D から選択され、U₇ は W、L、F、G、および V から選択され、U₈ は E および D から選択され、U₉ は E、D、Y、および V から選択され、U₁₀ は S、D、Y、T、および I から選択され、U₁₁ は I、Y、F、V、L、および T から選択され、U₁₂ は F、D、Y、L、I、V、A、G、および N から選択され、ならびに U₁₄ は D、Y、N、F、I、M、および P から選択される。

10

【0487】

実施形態 197 は、実施形態 196 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、U₁ は D、Y、V、および F から選択され、U₂ は D、Y、L、および F から選択され、U₄ は G および W から選択され、U₆ は E および D から選択され、U₇ は W、L、G、および F から選択され、U₈ は E および D から選択され、U₉ は E および D から選択され、U₁₀ は S、D、T、および Y から選択され、U₁₁ は I、Y、V、L、および F から選択され、U₁₂ は F、D、Y、G、A、および L から選択され、ならびに U₁₄ は D、Y、M、および N から選択される。

20

【0488】

実施形態 198 は、実施形態 174～197 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a} は、配列番号 797～823 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0489】

実施形態 199 は、実施形態 174～197 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a} は、配列番号 25、824～835、または 843～1690 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

30

【0490】

実施形態 200 は、実施形態 174～197 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a} は、配列番号 824～835 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0491】

実施形態 201 は、実施形態 174～197 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a} は、配列番号 810 に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 810 のアミノ酸配列に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0492】

実施形態 202 は、実施形態 174～197 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a} は、配列番号 811 に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 811 のアミノ酸配列に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0493】

実施形態 203 は、実施形態 174～197 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a} は、配列番号 834 に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 834 のアミノ酸配列に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

50

【0494】

実施形態204は、実施形態174～197のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a}は、配列番号810に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0495】

実施形態205は、実施形態174～197のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a}は、配列番号811に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0496】

実施形態206は、実施形態174～197のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、P_{1a}は、配列番号834に記載されるアミノ酸配列を含む。

10

【0497】

実施形態207は、実施形態174～206のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、H_{1a}は、アルブミンを含む。

【0498】

実施形態208は、実施形態174～206のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、H_{1a}は、Fcドメインを含む。

【0499】

実施形態209は、実施形態207に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、アルブミンは、血清アルブミンである。

20

【0500】

実施形態210は、実施形態209に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。

【0501】

実施形態211は、実施形態174～206のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、H_{1a}は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む。

【0502】

実施形態212は、実施形態211に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリペプチド、リガンド、または小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、またはCD35／CR1を結合する。

30

【0503】

実施形態213は、実施形態212に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスチレチン、1-酸性糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む。

【0504】

実施形態214は、実施形態212に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM、またはIgDを含む。

40

【0505】

実施形態215は、実施形態212に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、血清タンパク質は、アルブミンである。

【0506】

実施形態216は、実施形態211に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリペプチドは、抗体である。

【0507】

実施形態217は、実施形態216に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチ

50

ド複合体を含み、抗体は、シングルドメイン抗体、単鎖可変フラグメント、または F a b を含む。

【0508】

実施形態 218 は、実施形態 216 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体は、アルブミンに結合するシングルドメイン抗体を含む。

【0509】

実施形態 219 は、実施形態 216 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。

【0510】

実施形態 220 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、645 g H 1 g L 1 である。

10

【0511】

実施形態 221 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、645 d s g H 5 g L 4 である。

【0512】

実施形態 222 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、23-13-A01-sc02 である。

【0513】

実施形態 223 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、A10m3 またはそのフラグメントである。

20

【0514】

実施形態 224 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、DOM7r-31 である。

【0515】

実施形態 225 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、DOM7h-11-15 である。

【0516】

実施形態 226 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、Alb-1、Alb-8、または Alb-23 である。

30

【0517】

実施形態 227 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、10G である。

【0518】

実施形態 228 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、シングルドメイン抗体の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号 36 の HC-CDR1、配列番号 37 の HC-CDR2、および配列番号 38 の HC-CDR3 を含む。

【0519】

実施形態 229 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域 (CDR) である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、シングルドメイン抗体の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号 39 の HC-CDR1、配列番号 40 の HC-CDR2、および配列番号 41 の HC-CDR3 を含む。

40

【0520】

実施形態 230 は、実施形態 217 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、SA21 である。

【0521】

実施形態 231 は、実施形態 174 ~ 230 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペ

50

プチドまたはポリペプチド複合体を含み、 H_{1a} は、 H_{1a} を P_{1a} に接合する連結部分(L_{1a})を含む。

【0522】

実施形態232は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_{1a} は、少なくとも5～50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0523】

実施形態233は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_{1a} は、少なくとも10～30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0524】

実施形態234は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_{1a} は、少なくとも10のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0525】

実施形態235は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_{1a} は、少なくとも18のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0526】

実施形態236は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_{1a} は、少なくとも26のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0527】

実施形態237は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_{1a} は、 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ （配列番号836）、 $(GGGS)_n$ （配列番号837）、 $(GGGGS)_n$ （配列番号838）、および $(GSSGGS)_n$ （配列番号839）からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも1の整数である。

【0528】

実施形態238は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_{1a} は、配列番号30または31に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0529】

実施形態239は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、配列番号27～35のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0530】

実施形態240は、実施形態231に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 または L_2 は、リンカー4（ISSGLLSGRSDAG）（配列番号66）、リンカー5（AAGLLAPPGLSGRSDAG）（配列番号67）、リンカー6（SPLGLSGRSDAG）（配列番号68）、もしくはリンカー7（LSGRSDAGSPLGLAG）（配列番号69）のアミノ酸配列、または、リンカー4、リンカー5、リンカー6、もしくはリンカー7のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0531】

実施形態241は、以下の構成1に記載される構造配置を含む単離されたポリペプチド複合体であって、

【0532】

10

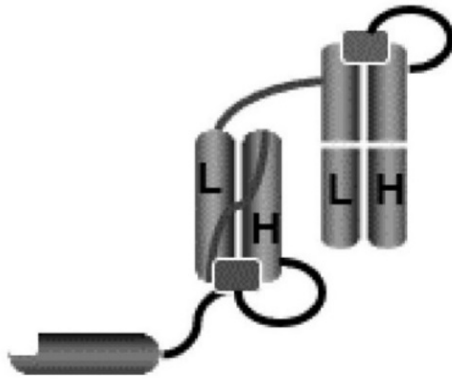
20

30

40

50

【化 4 7】



10

構成 1

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント（s c F v）を含み、s c F vは、エフェクター細胞抗原への s c F v の結合を損なわせるペプチド（P₁）に連結しており、かつ P₁は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分（L₁）によって、s c F v の重鎖可変ドメインの N 末端に連結しており、かつ P₁は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体（E G F R）に結合する F a b とにさらに連結しており、F a b は、F a b 軽鎖ポリペプチドおよび F a b 重鎖ポリペプチドを含み、F a b 軽鎖ポリペプチドは、s c F v の軽鎖可変ドメインの C 末端に連結しており、および、F a b は、P₂ および L₂ に連結しており、P₂は、E G F R への結合を損なわせるペプチドを含み、かつ L₂は、F a b 重鎖ポリペプチドを P₂ に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、単離されたポリペプチド複合体、を含む。

20

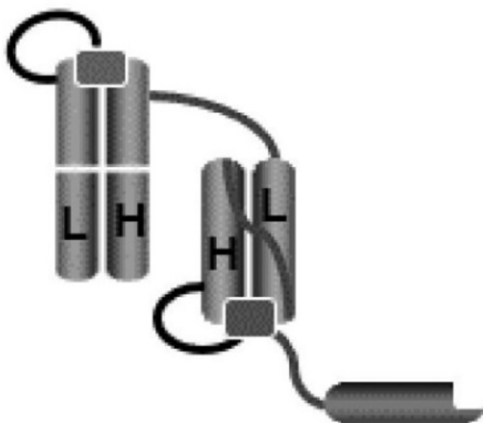
【0 5 3 3】

実施形態 2 4 2 は、以下の構成 2 に記載される構造配置を含む単離されたポリペプチド複合体であって、

30

【0 5 3 4】

【化 4 8】



40

構成 2

構成中、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、軽鎖可変ドメインおよび

50

重鎖可変ドメインを含む単鎖可変フラグメント (s c F v) を含み、s c F v は、エフェクター細胞抗原への s c F v の結合を損なわせるペプチド (P₁) に連結しており、かつ P₁ は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分 (L₁) によって、s c F v の重鎖可変ドメインの N 末端に連結しており、かつ P₁ は、半減期延長分子と上皮成長因子受容体 (E G F R) に結合する F a b とにさらに連結しており、F a b は、F a b 軽鎖ポリペプチドおよび F a b 重鎖ポリペプチドを含み、F a b 重鎖ポリペプチドは、s c F v の軽鎖可変ドメインの C 末端に連結しており、および、F a b は、P₂ および L₂ に連結しており、P₂ は、E G F R への結合を損なわせるペプチドを含み、かつ L₂ は、F a b 軽鎖ポリペプチドを P₂ に結合させ、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である連結部分を含む、単離されたポリペプチド複合体、を含む。

10

【0535】

実施形態 243 は、E G F R への抗 E G F R 結合ドメインの結合を損なわせるペプチドに連結される抗 E G F R 結合ドメインを含む単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 26、71~96、98~776 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または配列番号 26、71~96、98~776 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0536】

実施形態 244 は、実施形態 243 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 26、71~96、98~776 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

20

【0537】

実施形態 245 は、実施形態 243 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 26、86~96 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または配列番号 26、86~96 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0538】

実施形態 246 は、実施形態 245 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 26、86~96 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

30

【0539】

実施形態 247 は、実施形態 243 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 98~776 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または配列番号 98~776 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0540】

実施形態 248 は、実施形態 247 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 98~776 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0541】

実施形態 249 は、実施形態 243 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 99~118 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列、または配列番号 99~118 のいずれか 1 つに対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0542】

実施形態 250 は、実施形態 249 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 99~118 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0543】

実施形態 251 は、実施形態 243 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチ

50

ド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 71 に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 71 に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0544】

実施形態 252 は、実施形態 251 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 71 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0545】

実施形態 253 は、実施形態 243 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列、または配列番号 26 に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0546】

実施形態 254 は、実施形態 253 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0547】

実施形態 255 は、EGFR への抗 EGFR 結合の結合を損なわせるペプチドに連結される抗 EGFR 結合ドメインを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、 $X_1-C-X_2-X_3-X_4-X_5-D-X_6-A-X_7-P-X_8-C-X_9$ に記載されるアミノ酸配列を含み、 X_1 は P および L から選択され、 X_2 は R、L、T、A、N、I、V、S、H、および P から選択され、 X_3 は S、P、F、および Y から選択され、 X_4 は H、L、Q、P、R、F、N から選択され、 X_5 は I、F、Y、H、N、T、S、D、A、L、および V から選択され、 X_6 は T、P、N、L、I、V、S、D、H、A、および Y から選択され、 X_7 は K および Y から選択され、 X_8 は I、P、L、および M から選択され、ならびに X_9 は A、V、I、T、L、S、D、F、V、および H（配列番号 841）から選択される。

20

【0548】

実施形態 256 は、実施形態 255 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 X_1 は P および L から選択され、 X_2 は R、L、T、A、および N から選択され、 X_3 は S、P、および F から選択され、 X_4 は H、L、Q、および P から選択され、 X_5 は I、F、Y、H、N、および T から選択され、 X_6 は T、P、N、L、I、および V から選択され、 X_7 は K であり、 X_8 は I であり、ならびに X_9 は A、V、I、T、L、および S から選択される。

30

【0549】

実施形態 257 は、実施形態 256 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 X_1 は P であり、 X_2 は R、L、および T から選択され、 X_3 は S であり、 X_4 は H、L、Q、および P から選択され、 X_5 は I、F、Y、および T から選択され、 X_6 は T、P、N、および V から選択され、 X_7 は K であり、ならびに X_8 は I であり、ならびに X_9 は A、V、および I から選択される。

【0550】

実施形態 258 は、実施形態 255 ～ 257 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 98 ～ 776 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

40

【0551】

実施形態 259 は、実施形態 255 ～ 258 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 99 ～ 118 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0552】

実施形態 260 は、実施形態 255 ～ 257 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、配列番号 26 に記載されるアミノ酸配列を含む。

50

【0553】

実施形態261は、実施形態243～260のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗EGFR結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントを含む。

【0554】

実施形態262は、実施形態261に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体または抗体フラグメントは、単鎖可変フラグメント、シングルドメイン抗体、Fab、またはFab'を含む。

【0555】

実施形態263は、実施形態243～262のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗EGFR結合ドメインは、重鎖相補性決定領域であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、HC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号15のHC-CDR1、配列番号16のHC-CDR2、および配列番号17のHC-CDR3を含み、かつ抗EGFR結合ドメインは、軽鎖相補性決定領域であるLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3を含み、FabのLC-CDR1、LC-CDR2、およびLC-CDR3は、配列番号18のLC-CDR1、配列番号19のLC-CDR2、および配列番号20のLC-CDR3を含む。

10

【0556】

実施形態264は、実施形態261に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体または抗体フラグメントは、Fabを含む。

20

【0557】

実施形態265は、実施形態243～264のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗EGFR結合ドメインは、配列番号21～24のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0558】

実施形態266は、実施形態243～265のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗EGFR結合ドメインは、連結部分(L₁)によってペプチドに連結される。

【0559】

実施形態267は、実施形態243～266のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₁は、腫瘍特異的なプロテアーゼのための基質である。

30

【0560】

実施形態268は、実施形態243～267のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₁は、抗EGFR結合ドメインのN末端に結合される。

【0561】

実施形態269は、実施形態243～267のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₁は、抗EGFR結合ドメインのC末端に結合される。

40

【0562】

実施形態270は、実施形態243～267のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₁は、少なくとも5～50以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0563】

実施形態271は、実施形態243～267のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₁は、少なくとも10～30以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0564】

50

実施形態 272 は、実施形態 243～267 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、少なくとも 10 のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0565】

実施形態 273 は、実施形態 243～267 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、少なくとも 18 のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0566】

実施形態 274 は、実施形態 243～267 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、少なくとも 26 のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0567】

実施形態 275 は、実施形態 243～267 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、 $(G_2S)_n$ を含む式を有し、式中、 n は、1～3（配列番号 840）の整数である。

【0568】

実施形態 276 は、実施形態 243～267 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、 $(G_2S)_n$ 、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ （配列番号 836）、 $(GGGS)_n$ （配列番号 837）、 $(GGGGS)_n$ （配列番号 838）、および $(GSSGGS)_n$ （配列番号 839）からなる群から選択される式を有し、式中、 n は、少なくとも 1 の整数である。

【0569】

実施形態 277 は、実施形態 243～276 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ペプチドは、 L_1 が腫瘍特異的なプロテアーゼによって切断されると抗 EGF R 結合ドメインから結合解除され、それによって抗 EGF R 結合ドメインを EGF R に晒す。

【0570】

実施形態 278 は、実施形態 267～277 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、腫瘍特異的なプロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、およびアスパラギン酸プロテアーゼからなる群から選択される。

【0571】

実施形態 279 は、実施形態 278 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP 2、MMP 7、MMP 9、MMP 13、または MMP 14 を含む。

【0572】

実施形態 280 は、実施形態 278 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ（MTSP1）、ウロキナーゼ、またはヘブシンを含む。

【0573】

実施形態 281 は、実施形態 267～277 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、ウロキナーゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリプターゼで切断可能なアミノ酸配列、マトリックスメタロプロテアーゼで切断可能なアミノ酸配列、またはレグミンで切断可能なアミノ酸配列を含む。

【0574】

実施形態 282 は、実施形態 266 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、配列番号 30 または 31 のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0575】

実施形態 283 は、実施形態 266 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチ

10

20

30

40

50

ド複合体を含み、 L_1 は、配列番号27～35に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0576】

実施形態284は、実施形態266に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 L_1 は、リンカー4 (ISSGLLSGRSDAG) (配列番号66)、リンカー5 (AAGLLAPPGGLSGRSDAG) (配列番号67)、リンカー6 (SPLGLSGRSDAG) (配列番号68)、もしくはリンカー7 (LSGRSDAGSPLGLAG) (配列番号69)のアミノ酸配列、または、リンカー4、リンカー5、リンカー6、もしくはリンカー7のアミノ酸配列に対して1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0577】

実施形態285は、実施形態243～284のいずれか1つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、半減期延長分子 (H_1) をさらに含む。

【0578】

実施形態286は、実施形態285に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、半減期延長分子は、ペプチドに連結される。

【0579】

実施形態287は、実施形態285に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 H_1 は、ポリマーを含む。

【0580】

実施形態288は、実施形態287に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリマーは、ポリエチレングリコール (PEG) である。

【0581】

実施形態289は、実施形態285に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 H_1 は、アルブミンを含む。

【0582】

実施形態290は、実施形態285に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 H_1 は、Fcドメインを含む。

【0583】

実施形態291は、実施形態289に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、アルブミンは、血清アルブミンである。

【0584】

実施形態292は、実施形態289に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、アルブミンは、ヒト血清アルブミンである。

【0585】

実施形態293は、実施形態285に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、 H_1 は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む。

【0586】

実施形態294は、実施形態293に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリペプチド、リガンド、または小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、またはCD35/CR1を結合する。

【0587】

実施形態295は、実施形態294に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスチレチン、1-酸性糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む。

【0588】

実施形態296は、実施形態294に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4

10

20

30

40

50

、s l g A、I g M、またはI g Dを含む。

【0589】

実施形態297は、実施形態294に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、血清タンパク質は、アルブミンである。

【0590】

実施形態298は、実施形態294に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリペプチドは、抗体である。

【0591】

実施形態299は、実施形態298に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、抗体は、シングルドメイン抗体、単鎖可変フラグメント、またはF a bを含む。

10

【0592】

実施形態300は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、アルブミンに結合するシングルドメイン抗体を含む。

【0593】

実施形態301は、実施形態300に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。

【0594】

実施形態302は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、645 g H 1 g L 1である。

20

【0595】

実施形態303は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、645 d s g H 5 g L 4である。

【0596】

実施形態304は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、23-13-A01-s c 02である。

【0597】

実施形態305は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、A10m3またはそのフラグメントである。

30

【0598】

実施形態306は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、DOM7r-31である。

【0599】

実施形態307は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、DOM7h-11-15である。

【0600】

実施形態308は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、A l b-1、A l b-8、またはA l b-23である。

40

【0601】

実施形態309は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、10Eである。

【0602】

実施形態310は、実施形態299に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域（CDR）であるHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3を含み、シングルドメイン抗体のHC-CDR1、HC-CDR2、およびHC-CDR3は、配列番号36のHC-CDR1、配列番号37のHC-CDR2、および配列番号38のHC-CDR3を含む。

【0603】

50

実施形態 3 1 1 は、実施形態 2 9 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、配列番号 6 9 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0604】

実施形態 3 1 2 は、実施形態 2 9 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、相補性決定領域（CDR）である HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 を含み、シングルドメイン抗体の HC-CDR1、HC-CDR2、および HC-CDR3 は、配列番号 3 6 の HC-CDR1、配列番号 3 7 の HC-CDR2、および配列番号 3 8 の HC-CDR3 を含む。

【0605】

実施形態 3 1 3 は、実施形態 2 9 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、配列番号 4 2 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0606】

実施形態 3 1 4 は、実施形態 2 9 9 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、シングルドメイン抗体は、SA21 である。

【0607】

実施形態 3 1 5 は、実施形態 1 ~ 3 1 4 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、修飾されたアミノ酸、非天然アミノ酸、修飾された非天然アミノ酸、またはこれらの組合せを含む。

【0608】

実施形態 3 1 6 は、実施形態 3 1 5 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、修飾されたアミノ酸または修飾された非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。

【0609】

実施形態 3 1 7 は、実施形態 2 8 5 ~ 3 1 6 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、H₁ は、H₁ を P₁ に接続する連結部分（L₃）を含む。

【0610】

実施形態 3 1 8 は、実施形態 3 1 7 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₃ は、少なくとも 5 ~ 50 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0611】

実施形態 3 1 9 は、実施形態 3 1 7 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₃ は、少なくとも 10 ~ 30 以下のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0612】

実施形態 3 2 0 は、実施形態 3 1 7 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₃ は、少なくとも 10 のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0613】

実施形態 3 2 1 は、実施形態 3 1 7 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₃ は、少なくとも 18 のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0614】

実施形態 3 2 2 は、実施形態 3 1 7 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₃ は、少なくとも 26 のアミノ酸を有するペプチド配列である。

【0615】

実施形態 3 2 3 は、実施形態 3 1 7 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、L₃ は、(G₂S)_n、(GS)_n、(SGGS)_n（配列番号 8 3 6）、(GGGS)_n（配列番号 8 3 7）、(GGGGS)_n（配列番号 8 3 8）、およ

10

20

30

40

50

び (G S S G G S) _n (配列番号 8 3 9) からなる群から選択される式を有し、式中、*n* は、少なくとも 1 の整数である。

【0 6 1 6】

実施形態 3 2 4 は、実施形態 3 1 7 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、*L*₃ は、配列番号 2 9 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0 6 1 7】

実施形態 3 2 5 は、上記実施形態のいずれかに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、癌を処置する方法を含む。

【0 6 1 8】

実施形態 3 2 6 は、実施形態 3 2 5 に記載の方法を含み、癌は、EGFR を発現する細胞を有する。

【0 6 1 9】

実施形態 3 2 7 は、大腸癌 (CRC)、頭頸部扁平上皮癌 (SCCHN)、非小細胞肺癌 (NSCLC)、前立腺癌、乳癌、大腸癌、頭頸部癌、食道胃癌、肝臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、腎臓癌、または膵臓癌を処置する方法を含み、この方法は、上記実施形態のいずれかに記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体を、それを必要とする対象に投与する工程を含む。

【0 6 2 0】

実施形態 3 2 8 は、実施形態 3 2 7 に記載の方法を含み、それを必要とする対象は、EGFR 阻害薬治療に対して耐性を示す。

【0 6 2 1】

実施形態 3 2 9 は、実施形態 3 2 7 に記載の方法を含み、それを必要とする対象は、KRAS 突然変異を有する。

【0 6 2 2】

実施形態 3 3 0 は、実施形態 3 2 7 に記載の方法を含み、それを必要とする対象は、EGFR 阻害薬治療に対して耐性を示し、かつ KRAS 突然変異を有する。

【0 6 2 3】

実施形態 3 3 1 は、実施形態 1 ~ 7 7 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、*P*₂ は、配列番号 1 1 5 に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 1 1 5 に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0 6 2 4】

実施形態 3 3 2 は、実施形態 3 3 1 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、*P*₂ は、配列番号 1 1 5 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0 6 2 5】

実施形態 3 3 3 は、実施形態 1 ~ 7 7 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、*P*₂ は、配列番号 1 1 6 に記載されるアミノ酸配列、または、配列番号 1 1 6 に対して 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのアミノ酸変異、置換、もしくは欠失を有するアミノ酸配列を含む。

【0 6 2 6】

実施形態 3 3 4 は、実施形態 3 3 3 に記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、*P*₂ は、配列番号 1 1 6 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0 6 2 7】

実施形態 3 3 5 は、実施形態 2 5 5 ~ 2 5 7 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配列番号 1 1 5 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0 6 2 8】

実施形態 3 3 6 は、実施形態 2 5 5 ~ 2 5 7 のいずれか 1 つに記載の単離されたポリペプチドまたはポリペプチド複合体を含み、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、配

10

20

30

40

50

列番号 116 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【実施例】

【0629】

実施例 1。EGFR ポリペプチド複合体結合

EGFR-CD3 ポリペプチド複合体を、EGFR および CD3 ε 結合について評価した。

【0630】

簡潔には、ポリペプチド複合体分子を、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) フォーマットで、EGFR および CD28 に結合するそれらの能力について評価した。EGFR または CD3 のポリペプチド複合体結合を、プロテアーゼ処置の前後に測定した。簡潔には、ビオチン化抗原をニュートラアビジンでコーティングしたプレート上に捕捉した。指示があれば、ポリペプチド複合体分子を、活性マトリプターゼ (MTP1) を用いて処置した。次いで、緩衝液中で希釈したポリペプチド複合体分子を、抗原でコーティングしたプレートに添加した。結合したポリペプチド複合体を、標準的な西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を用いて検出した。50% 最大シグナルを達成するのに必要なポリペプチド複合体の濃度 (EC₅₀) を、Graphpad Prism ソフトウェアを用いて算出した。

【0631】

図 2 は、ELISA によって測定された EGFR へのポリペプチド分子結合を表す。図 3 は、ELISA によって測定された CD3 へのポリペプチド結合を表す。

【0632】

実施例 2。ポリペプチド複合体による腫瘍細胞毒性および T 細胞活性化の媒介

ポリペプチド複合体を、EGFR 陽性腫瘍細胞株である HCT116 および A431 を使用する機能的インビトロ腫瘍細胞死滅アッセイにおいて評価した。腫瘍細胞死滅は、腫瘍細胞がセンサーの表面に付着し、広がり、拡大するにつれて増加したセンサーインピーダンス測定値 (細胞指数) に依存する Agilent 製の xCelligence リアルタイム細胞アナライザーを用いて測定した。同様に、腫瘍細胞が死滅するにつれて、インピーダンスは減少した。10000 腫瘍細胞をウェル毎に添加し、96 ウェル E-プレート上に一晚付着させた。翌日、ヒト血清添加培地で 30000 CD8+T 細胞とともに滴定したポリペプチド複合体を、ウェルに加えた。細胞指数測定を 10 分毎にさらに 72 時間行った。次いで、細胞指数 × 数時間 (腫瘍細胞増殖動態) をポリペプチド複合体の濃度に対してプロットし、ここで、Graphpad Prism ソフトウェアを使用して、腫瘍増殖 50% を減少させるのに必要な濃度 (IC₅₀) を算出した。

【0633】

図 4 は、CD8+T 細胞の存在下におけるポリペプチド複合体によって媒介された HCT116 腫瘍細胞死滅のグラフを示す。図 5 は、CD8+T 細胞の存在下におけるポリペプチド複合体によって媒介された A431 腫瘍細胞死滅のグラフを示す。

【0634】

実施例 3。ポリペプチド複合体結合

ポリペプチド複合体を、EGFR および CD3 ε への結合研究において評価した。

【0635】

ヒトおよびカニクイザルの EGFR へのポリペプチド分子のキネティック結合を、Octet RED96 instrument を使用するバイオレイヤー干渉法によって評価した。簡潔には、バイオセンサーに抗原を負荷し、緩衝液中でベースライン化した。ポリペプチド分子を、50 nM、25 nM、12.5 nM、および 6.25 nM の溶液中で滴定し、その後、抗原負荷センサー上に会合させた。短い会合期間の後、センサーを緩衝液に移し、結合したポリペプチド分子の解離を測定した。実験のタイミングおよび工程を添付の表 7 に示す。会合シグナルと解離シグナルをリアルタイムで記録し、機器ソフトウェア内で 1:1 結合モデルを使用して分析した。1:1 結合モデルを用いた分析により、オンおよびオフの速度定数ならびに親和性 KD の算出が可能となった。オフ速度定数を、

添付の図に示すように半減期に変換した。データを図 6 に示す。

【 0 6 3 6 】

【表 9】

表 7

工程	時間	pH
ベースライン: Octet 緩衝液	60 秒	pH 7.4
負荷: 15nM のヒト EGFR 15nM のカニクイザル (cyno) EGFR	300 秒	pH 7.4
ベースライン: Octet 緩衝液	300 秒	pH 7.4
Octet 緩衝液における会合 50nM の PC1 25nM の PC1 12.5nM の PC1 6.25nM の PC1	300 秒	pH 7.4
解離: Octet 緩衝液	900 秒	pH 7.4

10

20

30

40

【 0 6 3 7 】

ポリペプチド複合体分子を、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) フォーマットでヒトおよびカニクイザルの抗原 E G F R に結合するそれらの能力についてさらに評価した。簡潔には、ヒト F c ドメインに溶解させた抗原を、高結合 E L I S A プレート上で直接被膜した。次いで、緩衝液中で希釈したポリペプチド複合体分子を、抗原でコーティングしたプレートに添加した。結合したポリペプチド複合体を、標準的な西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を用いて検出した。50%最大シグナルを達成するのに必要なポリペプチド複合体の濃度 (E C 5 0) を、G r a p h p a d P r i s m ソフトウェアを用いて算出した。データを図 7 に示す。

【 0 6 3 8 】

ヒトおよびカニクイザルの (c y n o) C D 3 へのポリペプチド分子のキネティック結

50

合を、Octet RED96 instrumentを使用するバイオレイヤー干渉法によって評価した。簡潔には、バイオセンサーに抗原を負荷し、緩衝液中でベースライン化した。ポリペプチド分子を、50 nM、25 nM、12.5 nM、および6.25 nMの溶液中で滴定し、その後、抗原負荷センサー上に会合させた。短い会合期間の後、センサーを緩衝液に移し、結合したポリペプチド分子の解離を測定した。実験のタイミングおよび工程を添付の表8に示す。会合シグナルと解離シグナルをリアルタイムで記録し、機器ソフトウェア内で1:1結合モデルを使用して分析した。1:1結合モデルを用いた分析により、オンおよびオフの速度定数ならびに親和性KDの算出が可能となった。オフ速度定数を、添付の図に示すように半減期に変換した。データを図8に示す。

【0639】

10

【表10】

表8

工程	時間	pH
ベースライン: Octet 緩衝液	60 秒	pH 7.4
負荷: 15nM のヒト CD3e 15nM のカニクイザル (cyno) CD3e	300 秒	pH 7.4
ベースライン: Octet 緩衝液	300 秒	pH 7.4
Octet 緩衝液における会合 50nM の PC1 25nM の PC1 12.5nM の PC1 6.25nM の PC1	300 秒	pH 7.4
解離: Octet 緩衝液	900 秒	pH 7.4

20

30

40

【0640】

ポリペプチド複合体分子を、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) フォーマットでヒトおよびカニクイザルの抗原CD3に結合するそれらの能力について評価した

50

。簡潔には、ヒトFcドメインに溶解させた抗原を、高結合ELISAプレート上で直接被膜した。次いで、緩衝液中で希釈したポリペプチド複合体分子を、抗原でコーティングしたプレートに添加した。結合したポリペプチド複合体を、標準的な西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を用いて検出した。50%最大シグナルを達成するのに必要なポリペプチド複合体の濃度(EC₅₀)を、Graphpad Prismソフトウェアを用いて算出した。データを図9に示す。

【0641】

実施例4。カニクイザル中のポリペプチド複合体の薬物動態学

ポリペプチド分子の薬物動態および探索的安全性を、カニクイザルにおいて評価した。簡潔には、体重約3kgのカニクイザルにポリペプチドをIVボラスとして投与し、有害事象の徴候について毎日観察した。生存中の有害事象は観察されなかった。投与後、血液を特定の時点でK₂ EDTAチューブに採取し、血漿に処理した。分析まで血漿を凍結保存した。血漿中のポリペプチド分子の濃度を、標準ELISA技術を介して、対照カニクイザル血漿中に希釈した参照標準に対して測定した。血漿濃度曲線を、分布相と消失相を表す標準二相指数方程式に当てはめた。薬物動態のフィッティングにより、表9~10に示されるC_{max}、半減期、分布容積、クリアランス、および7日間の曲線下面積(AUC)の算出が可能となった。カニクイザル中の測定された薬物動態は、ヒトにおける週一回の投与を支持した。データは、図10A~10Bに見られる。図10Aは、マスクを含む本明細書に記載されるポリペプチド複合体が、インビトロアッセイ中の同等のマスクされていないTCEよりも、EGFR発現腫瘍細胞のT細胞によって媒介された死滅において8500を超えて少なかったことを実証した。以下の図10Bおよび表9に見られるように、PC4(マスクされた)は、およそ94時間の半減期を示し、これは、約1時間の半減期を示したマスクされていないポリペプチド複合体と比較して、ヒトにおける週一回の投与を支持した。

【0642】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

	PC4 100ug/kg	単位
C _{MAX}	27.05	nM
t _{1/2}	94.47	時間
Vd	0.12	L
VSS	0.25	L
CL	0.28	mL/時間/kg
BW	3.00	kg
7 日 AUC	96,143	nM・分

【 0 6 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 0

	マスクされて いない ポリペプチド 10ug/kg	単位
C_{MAX}	1.66	nM
$t_{1/2}$	1.30	時間
Vd	0.24	L
VSS	1.08	L
CL	41.72	mL/時間/kg
BW	3.00	kg
7 日 AUC	75	nM・分

10

20

【0 6 4 4】

実施例 5。カニクイザル・サイトカイン放出中のポリペプチド複合体

30

IV ボーラスによるポリペプチド分子投与後のサイトカン放出を、カニクイザルにおいて評価した。簡潔には、体重約 3 kg のカニクイザルにポリペプチドを IV ボーラスとして投与し、有害事象の徴候について毎日観察した。生存中の有害事象は観察されなかった。投与後、血液を特定の時点で K 2 EDTA チューブに採取し、血漿に処理した。分析まで血漿を凍結保存した。BD biosciences の非ヒト霊長類サイトメトリー Th 1 / Th 2 ビーズアレイキットを製造者の指示に従って使用して、血漿試料をサイトカインについて分析した。血漿中のインターフェロン γ 、腫瘍壊死因子 α 、インターロイキン 6、インターロイキン 5、インターロイキン 4、およびインターロイキン 2 のレベルを、ビーズアレイキットとともに提供された参照標準に対して算出した。データは、図 1 1 A ~ 1 1 L および図 1 2 に見られる。図 1 2 は、100 μ g / kg の本明細書に記載されるポリペプチド複合体 (EGFR T R A C T r) の投与が、10 μ g / kg のマスクされていない EGFR - T C E と比べて、最小限のレベルの炎症性サイトカイン放出をもたらしたことを示し、これは、IL - 6 の 20 - fold expression を超えることにつながった。

40

【0 6 4 5】

実施例 6。カニクイザル毒性中のポリペプチド複合体

IV ボーラスによるポリペプチド分子投与後の全身性肝酵素を、カニクイザルにおいて評価した。簡潔には、体重約 3 kg のカニクイザルにポリペプチドを IV ボーラスとして投与し、有害事象の徴候について毎日観察した。生存中の有害事象は観察されなかった。投与後、血液を特定の時点で K 2 EDTA チューブに採取し、血漿に処理した。分析ま

50

で血漿を凍結保存した。潜在的な肝毒性の徴候として肝酵素アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の存在について血漿試料を分析した。ASTおよびALTのレベルは、肝毒性の欠如を示唆する投与後の試験した全ての時点について正常範囲内に留まった。ASTおよびALTは、Milliporeからの市販のキットに提供される指示書に従って定量化した。ASTおよびALTのレベルは、陽性対照参照標準に対して製造者の指示に従って算出した。データは、図13A～13Dに見られる。

【0646】

実施例7。ペプチドはEGFR IgGを結合し、かつEGFR IgGがEGFR抗原に結合するのを阻害する

10

表11のペプチド配列（ペプチドー1～ペプチドー6）を、ELISAフォーマットにおいてEGFR IgGへの結合について評価した（表11を参照）。簡潔には、ビオチン化ペプチドをニュートラアビジンでコーティングしたプレート上に捕捉した。次いで、緩衝液中で希釈したEGFR IgGを、ペプチドでコーティングしたプレートに添加した。結合したEGFR IgGを、標準的な西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を用いて検出した。ELISAシグナルを、対数スケールの抗体濃度に対してプロットした。最大半量結合シグナル（EC₅₀s）を観察するのに必要な抗体の濃度を、Graphpad Prismソフトウェアを用いて算出した。図14は、EGFR IgGへのペプチド結合についての結合曲線を示し、表12は、EGFR IgGへのペプチド結合についての算出されたEC₅₀sを提供する。配列番号76のペプチドー6は、この系列で試験したペプチドの中で、EGFR IgGに対する最も強い結合（最も低いEC₅₀）を示した。

20

【0647】

30

40

50

【表 1 3 - 1】

表 1 1。EGFR IgG結合およびEGFR IgG配列のペプチド配列

詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
ペプチド-1	DWCRSLMSYTDLCP	71
ペプチド-2	TSCADAHLIAPSCS	72
ペプチド-3	NCQWDRVEHTYACS	73
ペプチド-4	WVSCHDGSMTCTFH	74
ペプチド-5	MNCLNRLWVEYCLV	75
ペプチド-6	YCGQDNTWVREGCF	76
EGFR IgG (軽鎖)	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIG TNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIP SRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYC QQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	22
EGFR IgG (重鎖)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFS LTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSG GNTDYNTPTFTRLSINKDNSKSQVFFKM	842

【 0 6 4 8】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

NSLQSNDTAIYYCARALTYDYEFAYWG	
QGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG	
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT	
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL	10
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN	
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV	20
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA	
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT	
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP	
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS	30
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL	
SLSPGK	

【0 6 4 9】

【表 1 4】

表 1 2。EGFR IgG へのペプチド結合についての EC₅₀s

	ペプチド-1	ペプチド-2	ペプチド-3	ペプチド-4	ペプチド-5	ペプチド-6
EC ₅₀ (nM)	52	84	413	>1000	2	0.3

【0 6 5 0】

ペプチドがマスクとして機能するためには、それはまた、目的の抗体がその同族抗原に結合するのを阻害しなければならない。したがって、E L I S A ベースの競合阻害試験も

10

20

30

40

50

また、EGFR IgGがEGFR抗原に結合するのを阻害する各ペプチドの能力を試験するために使用した。ビオチン化抗原をニュートラアビジンでコーティングしたプレート上に捕捉し、ビオチンを用いてクエンチし、洗浄した。阻害ペプチドを希釈系列で滴定し、一定濃度の抗体とプレインキュベートした。次いで、阻害ペプチドおよび抗体混合物を抗原捕捉プレート上でインキュベートした。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を使用して、プレート結合抗原への抗体結合を検出した。ELISAシグナルを対数スケールペプチド濃度に対してプロットした（図15を参照）。シグナルの用量依存的減少は、同族抗原への抗体結合について競合するペプチドの指標であった。Graphpad Prismソフトウェアを使用して、50%最大シグナル（IC₅₀s）を達成するために必要なペプチドの阻害濃度を算出した。IC₅₀データを表13に示す。この系列で試験したペプチドのうち、ペプチド-6は、EGFR抗原へのEGFR IgG結合を阻害するのに最も有効であった。

10

【0651】

【表15】

表13。EGFR 抗原へのEGFR IgG 結合のペプチド阻害についての IC₅₀s

	ペプチド-1	ペプチド-2	ペプチド-3	ペプチド-4	ペプチド-5	ペプチド-6
IC ₅₀ (nM)	>300	>300	>300	>300	>300	50

20

【0652】

実施例8。ペプチドはEGFR Fabに結合し、かつEGFR FabがEGFR抗原に結合するのを阻害する

表14のペプチド配列を、ELISAフォーマットにおいてEGFR Fabへの結合について評価した。結合研究は、実施例7において上述したように実施した。結合曲線を図16に示し、結合についてのEC₅₀sを表15～16に示す。ペプチド-8およびペプチド-15は、この系列で試験したペプチドの中でEGFR Fabに対して最も強い結合親和性（最も低いEC₅₀s）を示した。

【0653】

30

40

50

【表 1 6】

表 1 4。αEGFR IgG 結合についてのペプチド配列

詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
ペプチド-7	WCTVWGDREQEVRCL	77
ペプチド-8	PCRSIDVAKPICV	26
ペプチド-9	STCVHYWMQLRSCV	78
ペプチド-10	GGCAHWVMRLSWCQ	79
ペプチド-11	LGCQHFLMKLATCG	80
ペプチド-12	GCGDGLHRMVRMWC	81
ペプチド-13	ACTVMGARQEVRCV	82
ペプチド-14	PCPALIDVAEVICV	83
ペプチド-15	YCNSVWQRGQLYWC	84
ペプチド-16	ECSHMEGTRWPLCS	85

【0 6 5 4】

【表 1 7】

表 1 5。αEGFR Fab へのペプチド結合についての EC₅₀s

	ペプチド-7	ペプチド-8	ペプチド-9	ペプチド-10	ペプチド-11	ペプチド-12
EC ₅₀ (nM)	>1000	8	>1000	>1000	42	>1000

【0 6 5 5】

【表 1 8】

表 1 6。αEGFR Fab へのペプチド結合についての EC₅₀s

	ペプチド-13	ペプチド-14	ペプチド-15	ペプチド-16	ペプチド-6
EC ₅₀ (nM)	>1000	>1000	7	34	458

【0 6 5 6】

競合的阻害試験も使用して、E I S Aフォーマットにおいて E G F R F a b が E G F R 抗原に結合するのを阻害する各ペプチドの能力を試験した。競合的阻害測定は、実施例 7 において上述したように実施した。E G F R 抗原への E G F R F a b 結合の用量依存

性ペプチド阻害を図 17 に示し、 IC_{50} データを表 17 ～ 18 に示す。特に、ペプチド-8（配列番号 26）は、EGFR 抗原への EGFR Fab 結合を阻害するのに最も有効であった。

【0657】

【表 19】

表 17。EGFR 抗原への α EGFR Fab 結合のペプチド阻害についての IC_{50} s

	ペプチド-7	ペプチド-8	ペプチド-9	ペプチド-10	ペプチド-11	ペプチド-12
IC_{50} (nM)	>300	0.3	>300	>300	>300	>300

10

【0658】

【表 20】

表 18。EGFR 抗原への α EGFR Fab 結合のペプチド阻害についての IC_{50} s

	ペプチド-13	ペプチド-14	ペプチド-15	ペプチド-16	ペプチド-6
IC_{50} (nM)	>300	>300	>300	>300	13

【0659】

実施例 9。配列活性関係－EGFR Fab ペプチド

20

配列活性関係（SAR）は、EGFR Fab への強い結合および EGFR 抗原への EGFR Fab 結合の阻害を示すことが見出されたペプチド-8 について確立された。配列活性関係は、ペプチド内の個々の残基をアラニンに突然変異させ、EGFR 抗原への EGFR Fab の結合を阻害するペプチドの能力に対する各突然変異の影響を測定することによって確立した。アラニンスキニング配列を表 19 に示す。

【0660】

30

40

50

【表 2 1】

表 1 9。アラニンスキャンペプチド配列

詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
ペプチド-8 (野生型)	PCRS <u>H</u> IDVAKPICV	26
ペプチド-17	<u>A</u> CRSHIDVAKPICV	86
ペプチド-18	PC <u>A</u> SHIDVAKPICV	87
ペプチド-19	PCRA <u>H</u> IDVAKPICV	88
ペプチド-20	PCRS <u>A</u> IDVAKPICV	89
ペプチド-21	PCRS <u>H</u> <u>A</u> DVAKPICV	90
ペプチド-22	PCRS <u>H</u> I <u>A</u> VAKPICV	91
ペプチド-23	PCRS <u>H</u> ID <u>A</u> AKPICV	92
ペプチド-24	PCRS <u>H</u> IDV <u>A</u> APICV	93
ペプチド-25	PCRS <u>H</u> IDVAK <u>A</u> ICV	94
ペプチド-26	PCRS <u>H</u> IDVAKP <u>A</u> CV	95
ペプチド-27	PCRS <u>H</u> IDVAKPICA <u>A</u>	96

【0 6 6 1】

阻害測定は、実施例 7 で上述したように E F I S A フォーマットで実施した。アラニンスキャンニングペプチドの競合阻害プロットを図 1 8 ～ 1 9 に示し、算出した IC_{50} s を表 2 0 ～ 2 1 に示す。そのアラニン突然変異がペプチドの阻害活性を有意に減少させた（または IC_{50} を有意に上昇させた）ペプチド残基は、突然変異に耐容性を示さなかった（耐容性を示さない、または「NT」と分類された）重要な残基とみなされた。そのアラニン突然変異がペプチドの阻害活性をいくらか減少させたペプチド残基は、いくらか耐容性を示すとみなされた（いくらか耐容性を示す、または「ST」と分類された）。そのアラニン突然変異が非突然変異ペプチド-8 配列と同様に起こるペプチド残基は、突然変異に実際に耐容性を示した（耐容性を示す、または「T」として分類される）重要でない部位とみなされた。

【0 6 6 2】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 0。ペプチド-8 アラニンスキャン突然変異体についての競合阻害および SAR データ

ペプチドの詳細	配列番号	IC ₅₀ (μM)	ペプチド-8 (IC ₅₀ アラニン 突然変異 体IC ₅₀ ペプチド-8) に対する IC ₅₀ にお ける倍率変化 (Fold shift)	アラニンスキャン の位置	突然変異に耐 容性を示す か?
ペプチド-8 (野生型)	26	3.9	--	--	--
ペプチド-17	86	16	4.1	Pro-1	NT
ペプチド-18	87	5.6	1.4	Arg-3	T
ペプチド-19	88	93	24	Ser-4	NT
ペプチド-20	89	11	2.8	His-5	ST
ペプチド-21	90	1.95	0.5	Ile-6	T
ペプチド-22	91	>100	ND	Asp-7	NT

10

20

【0 6 6 3】

【表 2 3】

表 2 1。ペプチド-8 アラニンスキャン突然変異体についての競合阻害および SAR データ

ペプチドの詳細	配列番号	IC ₅₀ (μM)	ペプチド-8 (IC ₅₀ アラニン 突然変異 体IC ₅₀ ペプチド-8) に対する IC ₅₀ にお ける倍率変化 (Fold shift)	アラニンスキャン の位置	突然変異に耐 容性を示す か?
ペプチド-8 (野生型)	26	1.4	--	--	--
ペプチド-23	92	3.8	2.7	Val-8	T
ペプチド-24	93	>100	ND	Lys-10	NT
ペプチド-25	94	>100	ND	Pro-11	NT
ペプチド-26	95	>100	ND	Ile-12	NT
ペプチド-27	96	3.1	2.2	Val-14	T

30

40

【0 6 6 4】

表 2 0～2 1 から見られるように、ペプチド-8 の A s p - 7、L y s - 1 0、P r o - 1 1、および I l e - 1 2 におけるアラニン突然変異は、耐容性が最も不良であり、これらの残基が E G F R 抗原への E G F R F a b 結合を阻害するための重要な残基であることを示唆した。突然変異研究は、P r o - 1 および S e r - 4 も結合阻害に重要であり得ることを示す。さらに、結果は、A r g - 3、I l e - 6、V a l - 8 および V a l - 1 4 が E G F R 抗原への E G F R 結合の阻害のための重要な残基であることを示す。

【0 6 6 5】

50

実施例 10。ペプチド-8 の最適化されたファージライブラリー構造

実施例 9 のペプチド配列活性関係を使用して、ペプチド-8 内の重要な残基をコードするコドンが最小限に突然変異され、アラニンスキャニング突然変異研究において耐容性を示した重要でない残基をコードするコドン（例えば、A r g - 3、I l e - 6、V a l - 8 および V a l - 14）が重度に突然変異された DNA オリゴライブラリーを構築した。得られたオリゴを、バクテリオファージの p i l l フィラメントへの融合を介して S A R 誘導ペプチドを提示するために使用されるバクテリオファージベクターにクローン化した。その後、関連するベクターを用いて、当該分野における標準的な技術を用いた細菌における増幅を介してファージ最適化ライブラリーを作製した。

【0666】

10

実施例 11。最適化されたファージライブラリーのパニング

ファージ最適化ライブラリーが完成すると、E G F R F a b 負荷ビーズを用いてファージライブラリーをバイオパニングした。複数回のパニングを行い、その中でバクテリオファージを E G F R F a b 負荷ビーズに結合させ、洗浄し、溶出させ、増幅させた。固定濃度の E G F R 抗原またはペプチド-8 を使用するパニングの各回中に、さらなる選択圧を含めた。パニング後、ファージ感染細菌を播種し、コロニーを 96 ウェルブロックに採取した。次いで、クローンファージを増幅し、遠心分離によって細菌細胞から分離した。飽和濃度の E G F R 抗原の存在下または非存在下で、ファージ含有上清を E G F R F a b コーティングプレートに対する結合 E L I S A で試験した。結合シグナルが E G F R の存在下で減少した場合、E G F R F a b に結合することができるファージを配列分析のために選択した。

20

【0667】

実施例 12。パニング E L I S A - E G F R F a b ペプチド

クローンファージを粗上清として回収し、標準的な E F I S A によってスクリーニングした。簡潔には、ビオチン化 E G F R F a b をニュートラアビジンでコーティングしたプレート上に捕捉した。クローンファージの添加前に、ウェルをブロッキング緩衝液および E G F R で、またはブロッキング緩衝液単独でインキュベートした。次いで、洗浄または吸引することなく、クローンファージ上清をウェルに添加し、短時間インキュベートした。次いで、ウェルを洗浄し、その後、西洋ワサビコンジュゲート抗 M 13 抗体を用いて結合ファージを検出した。その後、関心対象のクローンファージを配列分析に送った。

30

【0668】

ペプチド-8 ライブラリー配列のファージパニング結果を表 22 に示す。679 のクローンのファージ配列が同定された。コンセンサス配列は、W e b L o g o 3.7.4 を使用して表 22 のすべての配列から算出された。コンセンサス配列を図 20 に示す。

【0669】

40

50

【表 2 4】

【表 2 2】

表 2 2。αEGFR Fab ペプチド-8 ライブラリー配列のファージバニング結果。(‐)は、αEGFR Fab ペプチド-8 の対応する位置における同じアミノ酸を指す。

ファージ 番号	アミノ酸の位置配列														ファージ結合 ELISA			配列番号
															バック グラウ ンド シグナ ル	EGFR Fab シグナル	EGFR の存在下 における EGFR Fab シグナル	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
ファージ -1	P	C	R	S	H	I	D	V	A	K	P	I	C	V	0.071	2.596	0.084	98
ファージ -2	-	-	L	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.067	2.525	0.078	99
ファージ -3	-	-	T	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	T	0.068	2.592	0.082	100
ファージ -4	-	-	T	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.070	2.595	0.093	101
ファージ -5	-	-	L	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	L	0.078	2.582	0.077	102
ファージ -6	-	-	L	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	A	0.071	2.523	0.070	103
ファージ -7	-	-	L	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	A	0.069	2.599	0.076	104
ファージ -8	-	-	L	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.070	2.543	0.077	105
ファージ -9	-	-	L	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	-	0.073	2.513	0.083	106
ファージ -10	-	-	L	-	-	N	-	P	-	-	-	-	-	S	0.064	2.564	0.078	107
ファージ -11	-	-	T	-	Q	H	-	T	-	-	-	-	-	I	0.072	2.590	0.090	108
ファージ -12	-	-	T	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.073	2.503	0.091	109
ファージ -13	-	-	L	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	0.068	2.517	0.076	110
ファージ -14	-	-	L	-	-	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.066	2.589	0.068	111
ファージ -15	-	-	L	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.074	2.584	0.086	112
ファージ -16	-	-	N	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	T	0.082	2.545	0.084	113

【 0 6 7 0 】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1】

フアージ -17	-	-	N	-	-	F	-	I	-	-	-	-	-	L	0.067	2.606	0.090	114
フアージ -18	-	-	A	Y	-	N	-	P	-	-	-	-	-	S	0.075	2.577	0.089	115
フアージ -19	-	-	L	F	-	F	-	P	-	-	-	-	-	S	0.077	2.590	0.126	116
フアージ -20	-	-	T	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	A	0.071	2.625	0.376	117
フアージ -21	-	-	T	-	-	N	-	N	-	-	-	-	-	A	0.087	2.679	0.175	118
フアージ -22	-	-	L	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.074	2.588	0.070	119
フアージ -23	-	-	T	-	-	T	-	L	-	-	-	-	-	-	0.075	2.488	0.072	120
フアージ -24	-	-	L	-	Q	F	-	T	-	-	-	-	-	S	0.128	2.485	0.113	121
フアージ -25	-	-	L	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.096	2.475	0.085	122
フアージ -26	-	-	L	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	-	0.123	2.463	0.119	123
フアージ -27	-	-	I	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.097	2.461	0.085	124
フアージ -28	-	-	I	-	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	S	0.078	2.501	0.078	125
フアージ -29	-	-	L	-	-	H	-	P	-	-	-	-	-	A	0.076	2.597	0.072	126
フアージ -30	-	-	L	-	-	F	-	D	-	-	-	-	-	A	0.078	2.596	0.073	127
フアージ -31	-	-	A	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.083	2.595	0.079	128
フアージ -32	-	-	L	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	0.071	2.595	0.071	129
フアージ -33	-	-	T	-	R	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.083	2.593	0.081	130
フアージ -34	-	-	L	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	I	0.089	2.576	0.078	131
フアージ -35	-	-	T	-	-	H	-	L	-	-	-	-	-	-	0.083	2.575	0.079	132
フアージ -36	-	-	L	-	-	F	-	I	-	-	-	-	-	A	0.068	2.567	0.066	133
フアージ -37	-	-	V	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.070	2.533	0.068	134

10

20

30

40

【 0 6 7 1】

50

【表 2 5 - 2】

フアージ -38	-	-	L	-	-	H	-	A	-	-	-	-	-	L	0.069	2.513	0.068	135
フアージ -39	-	-	I	-	L	N	-	T	-	-	-	-	-	-	0.071	2.505	0.071	136
フアージ -40	-	-	L	-	Q	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.076	2.503	0.072	137
フアージ -41	-	-	L	-	L	F	-	T	-	Q	-	-	-	I	0.092	2.503	0.089	138
フアージ -42	-	-	T	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	I	0.079	2.500	0.079	139
フアージ -43	-	-	N	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	I	0.071	2.496	0.067	140
フアージ -44	-	-	L	-	L	Y	-	N	-	-	-	-	-	L	0.071	2.494	0.070	141
フアージ -45	-	-	L	-	-	D	-	T	-	-	-	-	-	T	0.106	2.494	0.083	142
フアージ -46	-	-	A	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	A	0.075	2.493	0.068	143
フアージ -47	-	-	P	F	-	F	-	P	-	-	-	-	-	-	0.086	2.492	0.080	144
フアージ -48	-	-	A	-	-	N	-	L	-	-	-	-	-	A	0.073	2.487	0.071	145
フアージ -49	-	-	I	-	Q	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.109	2.481	0.080	146
フアージ -50	-	-	I	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	0.077	2.476	0.076	147
フアージ -51	-	-	L	-	L	T	-	P	-	-	-	-	-	A	0.085	2.474	0.073	148
フアージ -52	-	-	T	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	A	0.104	2.473	0.088	149
フアージ -53	-	-	L	Y	-	H	-	P	-	-	-	-	-	A	0.099	2.472	0.092	150
フアージ -54	-	-	H	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.074	2.470	0.072	151
フアージ -55	-	-	L	-	-	S	-	P	-	-	-	-	-	S	0.112	2.470	0.108	152
フアージ -56	-	-	L	-	-	T	-	I	-	-	-	-	-	L	0.120	2.468	0.117	153
フアージ -57	-	-	L	F	-	F	-	P	-	-	-	-	-	A	0.112	2.464	0.097	154
フアージ -58	-	-	L	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	A	0.110	2.463	0.105	155

【 0 6 7 2】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 3】

フアージ	-59	-	-	L	-	P	H	-	T	-	-	-	-	-	L	0.076	2.462	0.073	156
フアージ	-60	-	-	T	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	I	0.106	2.461	0.084	157
フアージ	-61	-	-	V	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	L	0.103	2.461	0.095	158
フアージ	-62	-	-	T	-	-	L	-	T	-	-	-	-	-	A	0.123	2.459	0.114	159
フアージ	-63	-	-	L	-	L	F	-	D	-	-	-	-	-	A	0.081	2.456	0.079	160
フアージ	-64	-	-	N	-	-	H	-	L	-	-	-	-	-	-	0.074	2.448	0.074	161
フアージ	-65	-	-	I	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	I	0.142	2.446	0.132	162
フアージ	-66	-	-	A	-	-	F	-	I	-	-	-	-	-	L	0.103	2.445	0.097	163
フアージ	-67	-	-	T	-	-	F	-	S	-	-	-	-	-	I	0.069	2.442	0.066	164
フアージ	-68	-	-	T	-	-	F	-	S	-	-	-	-	-	S	0.132	2.433	0.124	165
フアージ	-69	-	-	T	-	L	V	-	T	-	-	-	-	-	A	0.132	2.424	0.120	166
フアージ	-70	-	-	L	-	L	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.153	2.423	0.136	167
フアージ	-71	-	-	I	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	A	0.114	2.419	0.113	168
フアージ	-72	-	-	V	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.122	2.415	0.102	169
フアージ	-73	-	-	N	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.109	2.369	0.087	170
フアージ	-74	-	-	V	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	A	0.108	2.358	0.093	171
フアージ	-75	-	-	L	-	-	V	-	P	-	-	-	-	-	-	0.092	2.349	0.089	172
フアージ	-76	-	-	L	-	-	S	-	D	-	-	-	-	-	A	0.074	2.331	0.071	173
フアージ	-77	-	-	T	-	-	H	-	I	-	-	-	-	-	-	0.109	2.316	0.085	174
フアージ	-78	-	-	L	-	F	Y	-	L	-	-	-	-	-	S	0.127	2.263	0.127	175
フアージ	-79	-	-	S	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	F	0.074	2.199	0.073	176

【 0 6 7 3】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 4】

フアージ -80	-	-	A	-	-	V	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.069	2.170	0.068	177
フアージ -81	-	-	L	-	L	D	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.166	0.072	178
フアージ -82	-	-	L	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	0.154	2.150	0.139	179
フアージ -83	-	-	T	-	-	A	-	T	-	N	-	-	-	-	A	0.074	2.132	0.071	180
フアージ -84	-	-	L	-	L	T	-	H	-	-	-	-	-	-	I	0.088	2.125	0.075	181
フアージ -85	-	-	F	-	-	H	-	P	-	-	-	-	-	-	-	0.100	2.121	0.088	182
フアージ -86	-	-	S	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.081	2.086	0.078	183
フアージ -87	-	-	A	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.128	1.993	0.123	184
フアージ -88	-	-	S	-	-	H	-	S	-	-	-	-	-	-	T	0.069	1.993	0.067	185
フアージ -89	-	-	T	-	P	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	I	0.077	1.983	0.075	186
フアージ -90	-	-	L	-	P	L	-	S	-	-	-	-	-	-	A	0.114	1.980	0.096	187
フアージ -91	-	-	L	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.072	1.972	0.071	188
フアージ -92	-	-	L	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	-	H	0.083	1.969	0.079	189
フアージ -93	-	-	A	-	-	Y	-	D	-	-	-	-	-	-	S	0.091	1.804	0.073	190
フアージ -94	-	-	S	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	A	0.091	1.785	0.083	191
フアージ -95	-	-	A	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.092	1.688	0.076	192
フアージ -96	-	-	T	-	Q	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.074	1.676	0.074	193
フアージ -97	-	-	A	-	-	H	-	L	-	-	-	-	-	-	I	0.080	1.670	0.080	194
フアージ -98	-	-	I	-	Q	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.075	1.469	0.073	195
フアージ -99	-	-	A	-	L	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	A	0.093	1.462	0.082	196
フアージ -100	-	-	L	-	-	S	-	A	-	-	-	-	-	-	-	0.123	1.428	0.087	197

【 0 6 7 4】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 5】

フアージ -101	-	-	A	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	L	0.078	1.428	0.076	198
フアージ -102	-	-	L	-	-	N	-	S	-	-	-	-	-	H	0.081	1.394	0.078	199
フアージ -103	-	-	I	-	-	L	-	P	-	-	-	-	-	S	0.078	1.164	0.074	200
フアージ -104	-	-	L	-	Q	T	-	D	-	-	-	-	-	-	0.080	1.138	0.075	201
フアージ -105	-	-	S	-	P	Y	-	S	-	-	-	-	-	A	0.106	1.008	0.090	202
フアージ -106	-	-	V	-	-	F	Y	T	-	Y	-	-	-	-	0.098	0.968	0.083	203
フアージ -107	-	-	T	-	L	H	-	N	-	-	-	-	-	T	0.077	0.635	0.075	204
フアージ -108	-	-	V	-	-	A	-	P	-	-	-	-	-	A	0.072	0.459	0.072	205
フアージ -109	-	-	A	-	L	S	-	D	-	-	-	-	-	I	0.075	0.329	0.067	206
フアージ -110	W	-	H	P	Q	S	-	P	-	Y	-	-	-	D	0.094	0.265	0.070	207
フアージ -111	-	-	A	-	Q	H	-	L	-	-	-	-	-	I	0.085	0.213	0.081	208
フアージ -112	L	-	H	P	Q	N	-	A	-	Y	-	N	-	F	0.081	0.071	0.090	209
フアージ -113	F	-	H	P	Q	A	-	L	-	Y	-	M	-	-	0.076	0.069	0.081	210
フアージ -114	W	-	H	P	Q	N	-	F	-	Y	-	M	-	D	0.078	0.067	0.086	211
フアージ -115	-	-	L	-	-	T	-	L	-	-	-	-	-	L	0.074	2.491	0.074	212
フアージ -116	-	-	A	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	I	0.074	2.485	0.074	213
フアージ -117	-	-	V	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	T	0.091	2.455	0.091	214
フアージ -118	-	-	V	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	S	0.070	2.362	0.070	215
フアージ -119	-	-	T	G	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.090	2.129	0.090	216
フアージ -120	-	-	N	-	M	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.068	2.496	0.068	217
フアージ -121	-	-	L	-	L	H	-	D	-	-	-	-	-	L	0.072	2.430	0.073	218

10

20

30

40

【 0 6 7 5】

50

【表 2 5 - 6】

フアージ -122	-	-	T	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.070	2.169	0.070	219
フアージ -123	-	-	N	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	-	0.069	2.479	0.069	220
フアージ -124	-	-	T	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	T	0.097	2.440	0.098	221
フアージ -125	-	-	I	G	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.072	2.576	0.073	222
フアージ -126	-	-	T	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	-	S	0.072	2.562	0.073	223
フアージ -127	-	-	L	-	-	H	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.070	2.528	0.071	224
フアージ -128	-	-	P	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.081	2.509	0.082	225
フアージ -129	-	-	S	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.067	2.479	0.068	226
フアージ -130	-	-	V	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.110	2.445	0.111	227
フアージ -131	-	-	T	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.088	2.485	0.090	228
フアージ -132	-	-	T	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.071	2.472	0.073	229
フアージ -133	-	-	T	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	A	0.107	2.395	0.108	230
フアージ -134	-	-	T	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.080	2.037	0.082	231
フアージ -135	-	-	T	-	-	F	-	I	-	-	-	-	-	-	A	0.079	2.649	0.081	232
フアージ -136	-	-	L	-	-	A	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.072	2.589	0.074	233
フアージ -137	-	-	T	-	-	V	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.070	2.517	0.072	234
フアージ -138	-	-	L	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.071	2.482	0.072	235
フアージ -139	-	-	L	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.082	2.161	0.083	236
フアージ -140	-	-	L	Y	P	S	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.483	0.075	237
フアージ -141	-	-	P	-	-	H	-	S	-	-	-	-	-	-	-	0.072	1.781	0.073	238
フアージ -142	-	-	N	-	-	T	-	N	-	-	-	-	-	-	T	0.077	2.601	0.079	239

10

20

30

40

【 0 6 7 6】

50

【表 2 5 - 7】

フアージ -143	-	-	N	-	-	F	-	S	-	-	-	-	-	-	A	0.077	2.006	0.079	240
フアージ -144	-	-	A	-	L	H	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.076	2.481	0.078	241
フアージ -145	-	-	S	-	L	Y	-	A	-	-	-	-	-	-	-	0.068	2.581	0.070	242
フアージ -146	-	-	T	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.074	2.395	0.076	243
フアージ -147	-	-	T	-	-	Y	-	H	-	-	-	-	-	-	A	0.118	2.404	0.120	244
フアージ -148	-	-	N	-	L	H	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.070	2.506	0.072	245
フアージ -149	-	-	L	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.067	2.600	0.070	246
フアージ -150	-	-	A	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	-	F	0.107	2.340	0.110	247
フアージ -151	-	-	T	-	-	E	-	I	-	-	-	-	-	-	L	0.073	2.628	0.076	248
フアージ -152	-	-	L	-	-	V	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.127	2.419	0.130	249
フアージ -153	-	-	T	-	-	H	-	P	-	-	-	-	-	-	I	0.076	2.473	0.079	250
フアージ -154	-	-	L	F	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.093	2.485	0.096	251
フアージ -155	-	-	T	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.068	2.546	0.072	252
フアージ -156	-	-	L	-	L	F	-	-	-	-	-	-	-	-	L	0.073	2.449	0.076	253
フアージ -157	-	-	I	-	L	V	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.070	2.234	0.073	254
フアージ -158	-	-	L	-	-	Y	-	N	-	-	-	-	-	-	I	0.069	2.491	0.072	255
フアージ -159	-	-	N	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.073	1.550	0.075	256
フアージ -160	-	-	L	-	L	T	-	-	-	-	-	-	-	-	S	0.072	2.152	0.075	257
フアージ -161	-	-	L	-	-	D	-	D	-	-	-	-	-	-	A	0.084	2.459	0.088	258
フアージ -162	-	-	T	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.498	0.077	259
フアージ -163	-	-	L	-	-	H	-	N	-	-	-	-	-	-	S	0.075	2.483	0.079	260

10

20

30

40

【 0 6 7 7】

50

【表 2 5 - 8】

フアージ -164	-	-	S	-	-	N	-	P	-	-	-	-	-	S	0.072	2.575	0.076	261
フアージ -165	-	-	T	G	P	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.073	2.512	0.078	262
フアージ -166	-	-	N	-	L	F	-	D	-	-	-	-	-	-	0.068	2.396	0.072	263
フアージ -167	-	-	V	-	-	H	-	P	-	-	-	-	-	A	0.072	2.021	0.076	264
フアージ -168	-	-	T	-	-	F	-	I	-	-	-	-	-	T	0.070	2.581	0.074	265
フアージ -169	-	-	T	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	0.130	2.419	0.134	266
フアージ -170	-	-	T	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	S	0.074	2.478	0.078	267
フアージ -171	-	-	T	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	0.073	2.525	0.078	268
フアージ -172	-	-	T	-	-	H	-	L	-	-	-	-	-	A	0.071	2.440	0.076	269
フアージ -173	-	-	T	-	L	D	-	T	-	-	-	-	-	T	0.073	2.238	0.078	270
フアージ -174	-	-	A	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.070	2.403	0.075	271
フアージ -175	-	-	N	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	S	0.072	2.496	0.078	272
フアージ -176	-	-	T	G	P	H	-	-	-	-	-	-	-	A	0.074	2.465	0.080	273
フアージ -177	-	-	P	F	-	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.073	2.593	0.078	274
フアージ -178	-	-	L	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	0.073	2.504	0.078	275
フアージ -179	-	-	A	Y	-	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.073	2.508	0.079	276
フアージ -180	-	-	L	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	I	0.102	2.526	0.108	277
フアージ -181	-	-	S	-	-	T	-	P	-	-	-	-	-	A	0.071	1.659	0.075	278
フアージ -182	-	-	L	-	-	T	-	T	-	Q	-	-	-	-	0.109	2.458	0.115	279
フアージ -183	-	-	A	-	N	Y	-	L	-	-	-	-	-	T	0.077	2.344	0.082	280
フアージ -184	-	-	T	-	-	T	-	D	-	-	-	-	-	I	0.073	1.572	0.076	281

【 0 6 7 8】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 9】

フアージ -185	-	-	A	F	Q	N	-	P	-	-	-	-	-	S	0.065	2.489	0.072	282
フアージ -186	-	-	L	-	-	A	-	T	-	-	-	-	-	T	0.070	2.504	0.077	283
フアージ -187	-	-	L	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	I	0.071	2.449	0.078	284
フアージ -188	-	-	L	-	N	T	-	-	-	-	-	-	-	I	0.090	0.618	0.092	285
フアージ -189	-	-	T	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	L	0.074	2.574	0.080	286
フアージ -190	-	-	L	-	-	A	-	P	-	-	-	-	-	A	0.108	2.494	0.115	287
フアージ -191	-	-	L	-	-	H	-	S	-	-	-	-	-	S	0.077	2.473	0.084	288
フアージ -192	-	-	L	F	P	H	-	P	-	-	-	-	-	A	0.074	2.477	0.081	289
フアージ -193	-	-	T	-	-	S	-	I	-	-	-	-	-	A	0.077	1.708	0.081	290
フアージ -194	-	-	L	-	L	H	-	T	-	-	-	-	-	T	0.085	2.485	0.092	291
フアージ -195	-	-	A	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	0.082	2.466	0.090	292
フアージ -196	-	-	V	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	L	0.067	2.482	0.074	293
フアージ -197	-	-	T	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	T	0.070	2.576	0.077	294
フアージ -198	-	-	I	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	L	0.071	2.481	0.079	295
フアージ -199	-	-	I	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.070	2.442	0.078	296
フアージ -200	-	-	L	-	-	A	-	T	-	-	-	-	-	A	0.069	2.456	0.077	297
フアージ -201	-	-	T	-	-	H	-	I	-	-	-	-	-	T	0.076	2.616	0.084	298
フアージ -202	-	-	T	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	A	0.069	2.505	0.076	299
フアージ -203	-	-	T	-	-	A	-	T	-	-	-	-	-	T	0.071	2.537	0.079	300
フアージ -204	-	-	A	-	P	Y	-	D	-	-	-	-	-	T	0.068	1.894	0.074	301
フアージ -205	-	-	L	-	P	V	-	T	-	-	-	-	-	A	0.071	2.410	0.079	302

【 0 6 7 9】

10

20

30

40

50

【表 25-10】

フアージ -206	-	-	A	-	L	N	-	T	-	-	-	-	-	-	0.070	2.553	0.079	303
フアージ -207	-	-	L	-	-	N	-	N	-	-	-	-	-	A	0.072	2.564	0.081	304
フアージ -208	-	-	L	-	M	T	-	T	-	-	-	-	-	T	0.070	2.480	0.078	305
フアージ -209	-	-	L	-	L	F	-	I	-	-	-	-	-	I	0.072	2.505	0.081	306
フアージ -210	-	-	T	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	-	0.072	2.498	0.080	307
フアージ -211	-	-	-	-	Y	F	H	S	P	-	-	-	-	A	0.083	2.504	0.092	308
フアージ -212	-	-	T	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.074	2.354	0.082	309
フアージ -213	-	-	S	-	L	F	-	L	-	-	-	-	-	S	0.080	2.502	0.089	310
フアージ -214	-	-	V	-	-	S	-	T	-	-	-	-	-	A	0.068	1.836	0.075	311
フアージ -215	-	-	N	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.068	2.519	0.077	312
フアージ -216	-	-	A	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	S	0.082	2.570	0.092	313
フアージ -217	-	-	I	-	R	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	0.067	2.077	0.075	314
フアージ -218	-	-	S	-	-	T	-	L	-	-	-	-	-	-	0.076	0.724	0.078	315
フアージ -219	-	-	T	-	-	L	-	T	-	-	-	-	-	F	0.067	2.602	0.077	316
フアージ -220	-	-	L	-	-	S	-	N	-	-	-	-	-	F	0.070	2.376	0.080	317
フアージ -221	-	-	A	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	A	0.070	2.594	0.081	318
フアージ -222	-	-	V	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	F	0.074	2.491	0.084	319
フアージ -223	-	-	L	-	-	Y	-	H	-	-	-	-	-	S	0.074	2.463	0.084	320
フアージ -224	-	-	T	-	-	N	-	L	-	-	-	-	-	-	0.071	2.477	0.081	321
フアージ -225	-	-	T	-	-	F	-	A	-	-	-	-	-	S	0.073	2.380	0.083	322
フアージ -226	-	-	L	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	T	0.075	2.445	0.085	323

10

20

30

40

【0680】

50

【表 2 5 - 1 1】

フアージ -227	-	-	L	-	Q	Y	-	D	-	-	-	-	-	A	0.079	2.412	0.090	324
フアージ -228	-	-	H	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	L	0.072	2.269	0.082	325
フアージ -229	-	-	T	-	Q	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	0.070	2.450	0.081	326
フアージ -230	-	-	N	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	0.085	2.472	0.096	327
フアージ -231	-	-	L	-	-	L	-	T	-	-	-	-	-	T	0.073	2.495	0.084	328
フアージ -232	-	-	S	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	Y	0.065	1.908	0.074	329
フアージ -233	-	-	A	-	L	F	-	N	-	-	-	-	-	I	0.070	2.119	0.080	330
フアージ -234	-	-	T	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	T	0.081	2.483	0.092	331
フアージ -235	-	-	L	-	Q	H	-	D	-	-	-	-	-	-	0.069	0.848	0.072	332
フアージ -236	-	-	V	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	L	0.074	2.641	0.087	333
フアージ -237	-	-	L	-	-	T	-	S	-	-	-	-	-	-	0.124	2.441	0.136	334
フアージ -238	R	-	S	-	-	H	-	T	-	-	I	-	-	G	0.071	2.472	0.083	335
フアージ -239	-	-	L	-	-	H	-	Y	-	-	-	-	-	L	0.074	2.572	0.087	336
フアージ -240	-	-	N	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.093	2.501	0.106	337
フアージ -241	-	-	L	F	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	S	0.075	2.502	0.088	338
フアージ -242	-	-	L	F	-	N	-	P	-	-	-	-	-	Y	0.074	2.535	0.087	339
フアージ -243	-	-	T	-	-	F	-	A	-	-	-	-	-	A	0.074	2.289	0.086	340
フアージ -244	-	-	A	-	-	H	-	N	-	-	-	-	-	L	0.071	2.348	0.083	341
フアージ -245	-	-	N	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	L	0.068	2.588	0.081	342
フアージ -246	-	-	L	-	-	F	-	Y	-	-	-	-	-	T	0.066	2.449	0.079	343
フアージ -247	-	V	C	L	S	F	R	Y	R	Q	A	D	L	C	0.130	2.417	0.142	344

【 0 6 8 1】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 2】

フアージ	-	-	I	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.069	2.617	0.082	345
フアージ	-	-	L	-	P	F	-	N	-	-	-	-	-	-	T	0.100	2.362	0.113	346
フアージ	-	-	T	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	-	L	0.072	2.507	0.085	347
フアージ	-	-	L	-	-	S	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.068	1.565	0.077	348
フアージ	-	-	L	-	-	S	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.067	2.496	0.080	349
フアージ	-	-	T	-	P	F	-	L	-	-	-	-	-	-	T	0.084	0.883	0.088	350
フアージ	-	-	T	-	P	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	A	0.073	1.856	0.083	351
フアージ	-	-	A	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.071	2.369	0.084	352
フアージ	-	-	P	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.069	2.503	0.084	353
フアージ	-	-	L	-	-	S	-	S	-	-	-	-	-	-	-	0.080	2.231	0.093	354
フアージ	-	-	T	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.069	2.597	0.084	355
フアージ	-	-	L	-	-	V	-	N	-	-	-	-	-	-	-	0.070	1.452	0.079	356
フアージ	-	-	L	-	Q	Y	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.070	1.384	0.078	357
フアージ	-	-	L	G	P	F	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.076	2.322	0.090	358
フアージ	-	-	L	-	-	T	-	P	-	-	-	-	-	-	I	0.076	2.462	0.091	359
フアージ	-	-	T	-	-	Y	-	S	-	-	-	-	-	-	A	0.067	2.375	0.082	360
フアージ	-	-	L	-	F	T	-	-	-	-	-	-	-	-	S	0.093	2.466	0.108	361
フアージ	-	-	L	-	-	S	-	N	-	-	-	-	-	-	T	0.082	1.920	0.094	362
フアージ	-	-	T	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.081	2.458	0.096	363
フアージ	-	-	T	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.070	2.476	0.086	364
フアージ	-	-	V	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.080	2.494	0.096	365

【 0 6 8 2】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 3】

フアージ -269	-	-	L	-	L	T	-	S	-	-	-	-	-	-	A	0.072	2.320	0.087	366
フアージ -270	-	-	T	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	L	0.076	2.572	0.093	367
フアージ -271	-	-	L	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	-	I	0.115	2.428	0.131	368
フアージ -272	-	-	T	-	-	S	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.492	0.090	369
フアージ -273	-	-	A	Y	-	N	-	P	-	-	T	-	-	-	S	0.072	2.468	0.089	370
フアージ -274	-	-	L	-	P	H	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.070	2.473	0.087	371
フアージ -275	-	-	I	-	L	T	-	N	-	-	-	-	-	-	S	0.075	1.899	0.089	372
フアージ -276	-	-	A	-	Q	F	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.090	1.979	0.104	373
フアージ -277	-	-	T	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.077	2.492	0.095	374
フアージ -278	-	-	L	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	A	0.075	2.489	0.094	375
フアージ -279	-	-	I	-	P	Y	-	N	-	-	-	-	-	-	I	0.084	0.989	0.091	376
フアージ -280	-	-	I	-	Q	T	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.074	1.579	0.086	377
フアージ -281	-	-	T	-	L	H	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.070	2.573	0.091	378
フアージ -282	-	-	S	-	F	D	N	P	T	Q	-	-	-	-	A	0.080	2.480	0.100	379
フアージ -283	-	-	N	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.077	2.485	0.097	380
フアージ -284	-	-	P	-	-	Y	-	A	-	-	-	-	-	-	-	0.068	2.552	0.090	381
フアージ -285	-	-	I	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.412	0.093	382
フアージ -286	-	-	L	-	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.075	2.512	0.098	383
フアージ -287	-	-	V	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.072	2.466	0.096	384
フアージ -288	-	-	T	-	L	A	-	P	-	-	-	-	-	-	I	0.074	1.189	0.085	385
フアージ -289	-	-	T	-	L	L	-	D	-	-	-	-	-	-	T	0.071	1.094	0.082	386

10

20

30

40

【 0 6 8 3】

50

【表 2 5 - 1 4】

フアージ -290	-	-	A	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	T	0.106	2.374	0.130	387
フアージ -291	-	-	A	-	P	Y	-	L	-	-	-	-	-	T	0.080	2.529	0.106	388
フアージ -292	-	-	L	-	-	N	-	S	-	-	-	-	-	A	0.112	2.417	0.136	389
フアージ -293	-	-	T	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	T	0.071	2.478	0.097	390
フアージ -294	-	-	L	-	-	N	-	H	S	-	-	-	-	S	0.075	2.502	0.101	391
フアージ -295	-	-	T	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	0.071	1.560	0.088	392
フアージ -296	-	-	L	Y	L	N	-	P	-	-	-	-	-	L	0.079	2.295	0.103	393
フアージ -297	-	-	L	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	S	0.066	2.624	0.095	394
フアージ -298	-	-	N	Y	-	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.070	2.418	0.097	395
フアージ -299	-	-	A	-	Q	Y	-	T	-	-	-	-	-	T	0.089	1.848	0.110	396
フアージ -300	-	-	T	-	L	H	-	D	-	-	-	-	-	L	0.077	1.446	0.095	397
フアージ -301	-	-	T	-	-	N	N	N	-	-	-	-	-	A	0.074	2.486	0.108	398
フアージ -302	-	-	L	F	-	N	-	P	-	Q	-	-	-	A	0.076	2.597	0.112	399
フアージ -303	-	-	L	-	-	D	-	A	-	-	-	-	-	P	0.105	2.443	0.139	400
フアージ -304	-	-	L	-	-	Y	-	N	-	-	-	-	-	T	0.072	2.525	0.110	401
フアージ -305	-	-	A	-	-	A	-	T	-	-	-	-	-	A	0.098	2.443	0.140	402
フアージ -306	-	-	T	-	-	H	-	P	S	-	-	-	-	-	0.126	2.443	0.168	403
フアージ -307	-	-	T	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	T	0.068	2.484	0.121	404
フアージ -308	-	-	A	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	-	0.075	0.831	0.093	405
フアージ -309	-	-	S	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.072	2.633	0.169	406
フアージ -310	-	-	S	-	P	F	-	P	-	-	-	-	-	A	0.063	2.617	0.264	407

10

20

30

40

【 0 6 8 4】

50

10

20

30

40

【 0 6 8 5 】

【表 2 5 - 1 6】

フアージ -332	-	-	L	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.068	2.611	0.078	429
フアージ -333	-	-	I	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.070	2.509	0.080	430
フアージ -334	-	-	L	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.104	2.468	0.115	431
フアージ -335	-	-	T	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.070	2.494	0.081	432
フアージ -336	-	-	L	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.067	2.607	0.079	433
フアージ -337	-	-	A	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.067	2.461	0.083	434
フアージ -338	-	-	L	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.068	2.541	0.084	435
フアージ -339	-	-	T	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.085	2.513	0.107	436
フアージ -340	-	-	N	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.073	2.502	0.095	437
フアージ -341	-	-	T	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.074	2.592	0.069	438
フアージ -342	-	-	L	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.085	2.587	0.076	439
フアージ -343	-	-	A	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.067	2.509	0.066	440
フアージ -344	-	-	L	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.088	2.497	0.075	441
フアージ -345	-	-	L	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.068	2.603	0.070	442
フアージ -346	-	-	L	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.072	2.600	0.075	443
フアージ -347	-	-	N	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.075	2.499	0.083	444
フアージ -348	-	-	L	Y	-	N	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.071	2.519	0.097	445
フアージ -349	-	-	L	F	-	N	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.074	2.678	0.124	446
フアージ -350	-	-	T	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.073	2.586	0.072	447
フアージ -351	-	-	L	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.072	2.584	0.069	448
フアージ -352	-	-	T	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.093	2.552	0.089	449

10

20

30

40

【 0 6 8 6】

50

【表 2 5 - 1 7】

フアージ -353	-	-	N	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	L	0.070	2.612	0.101	450
フアージ -354	-	-	L	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	-	S	0.082	2.592	0.075	451
フアージ -355	-	-	L	-	-	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	A	0.093	2.583	0.077	452
フアージ -356	-	-	A	Y	-	H	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.084	2.573	0.083	453
フアージ -357	-	-	N	-	L	H	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.090	2.564	0.074	454
フアージ -358	-	-	T	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.558	0.064	455
フアージ -359	-	-	A	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	-	-	0.085	2.550	0.070	456
フアージ -360	-	-	A	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.072	2.532	0.069	457
フアージ -361	-	-	V	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.082	2.523	0.082	458
フアージ -362	-	-	N	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.071	2.483	0.069	459
フアージ -363	-	-	A	-	L	F	-	N	-	-	-	-	-	-	T	0.104	2.479	0.093	460
フアージ -364	-	-	L	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	I	0.104	2.474	0.092	461
フアージ -365	-	-	V	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.089	2.471	0.075	462
フアージ -366	-	-	L	-	-	D	-	P	-	-	-	-	-	-	L	0.092	2.465	0.089	463
フアージ -367	-	-	I	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.080	2.457	0.073	464
フアージ -368	-	-	N	-	-	N	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.071	2.456	0.067	465
フアージ -369	-	-	T	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.101	2.455	0.101	466
フアージ -370	-	-	L	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.077	2.455	0.071	467
フアージ -371	-	-	L	-	-	S	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.075	2.454	0.070	468
フアージ -372	-	-	T	-	L	H	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.092	2.446	0.086	469
フアージ -373	-	-	N	-	L	H	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.084	2.445	0.076	470

【 0 6 8 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1 8】

フアージ -374	-	-	L	-	Q	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.126	2.435	0.111	471
フアージ -375	-	-	L	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.107	2.432	0.091	472
フアージ -376	-	-	L	-	P	F	-	D	-	-	-	-	-	-	A	0.127	2.430	0.123	473
フアージ -377	-	-	A	-	-	A	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.073	2.428	0.073	474
フアージ -378	-	-	T	-	-	N	-	P	-	-	-	-	-	-	I	0.089	2.425	0.075	475
フアージ -379	-	-	A	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.083	2.423	0.071	476
フアージ -380	-	-	L	-	-	H	-	I	-	-	-	-	-	-	S	0.140	2.422	0.121	477
フアージ -381	-	-	A	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.092	2.419	0.090	478
フアージ -382	-	-	T	-	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	S	0.066	2.419	0.065	479
フアージ -383	-	-	P	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.146	2.413	0.126	480
フアージ -384	-	-	S	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.082	2.412	0.077	481
フアージ -385	-	-	T	-	-	Y	-	N	-	-	-	-	-	-	S	0.075	2.406	0.073	482
フアージ -386	-	-	V	-	-	T	-	S	-	-	-	-	-	-	-	0.086	2.398	0.078	483
フアージ -387	-	-	V	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	A	0.096	2.372	0.077	484
フアージ -388	-	-	L	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.070	2.367	0.069	485
フアージ -389	-	-	L	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	-	L	0.107	2.367	0.081	486
フアージ -390	L	-	Y	-	-	H	W	I	-	-	L	-	-	-	H	2.341	2.360	2.220	487
フアージ -391	-	-	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	A	0.105	2.357	0.090	488
フアージ -392	-	-	T	-	L	N	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.149	2.343	0.139	489
フアージ -393	-	-	N	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.072	2.341	0.069	490
フアージ -394	-	-	T	-	-	T	-	N	-	-	-	-	-	-	T	0.142	2.334	0.128	491

10

20

30

40

【 0 6 8 8 】

50

10

20

30

40

【 0 6 8 9 】

【表 2 5 - 2 0】

フアージ	-	-	V	-	L	T	-	N	-	-	-	-	-	T	0.084	1.715	0.072	513
フアージ	-	-	V	-	L	T	-	N	-	-	-	-	-	L	0.070	1.621	0.068	514
フアージ	V	-	L	-	V	R	S	R	Q	A	D	L	-	R	0.130	1.558	0.126	515
フアージ	-	-	H	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	T	0.095	1.527	0.088	516
フアージ	-	-	L	-	P	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	0.086	1.518	0.069	517
フアージ	-	-	N	-	-	D	-	T	-	-	-	-	-	S	0.092	1.421	0.089	518
フアージ	-	-	A	Y	Q	N	-	P	-	-	-	-	-	S	0.106	1.313	0.105	519
フアージ	-	-	S	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	-	0.106	1.297	0.105	520
フアージ	-	-	I	-	-	H	-	A	-	-	-	-	-	A	0.112	1.252	0.097	521
フアージ	-	-	H	-	R	H	-	T	-	-	-	-	-	A	0.119	1.244	0.076	522
フアージ	-	-	T	-	-	F	-	H	-	-	-	-	-	T	0.084	1.196	0.080	523
フアージ	-	-	I	-	L	Y	-	H	-	-	-	-	-	-	0.097	1.055	0.092	524
フアージ	-	-	L	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	S	0.097	0.952	0.089	525
フアージ	-	-	I	A	-	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.076	0.927	0.071	526
フアージ	-	-	L	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	T	0.111	0.918	0.094	527
フアージ	-	-	A	-	Q	Y	-	N	-	-	-	-	-	A	0.103	0.879	0.083	528
フアージ	-	-	L	-	L	S	-	P	-	-	-	-	-	T	0.082	0.848	0.078	529
フアージ	-	-	A	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	T	0.154	0.759	0.123	530
フアージ	-	-	L	-	-	N	-	L	-	-	-	-	-	-	0.088	0.746	0.085	531
フアージ	-	-	S	-	-	N	-	N	-	-	-	-	-	L	0.080	0.712	0.075	532
フアージ	-	-	A	-	N	H	-	D	-	-	-	-	-	L	0.079	0.686	0.075	533

10

20

30

40

【 0 6 9 0】

50

【表 2 5 - 2 1】

フアージ -437	-	-	N	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	F	0.105	0.613	0.092	534
フアージ -438	-	-	A	-	-	F	-	F	-	-	-	-	-	A	0.070	0.600	0.069	535
フアージ -439	-	-	I	-	-	N	-	H	-	-	-	-	-	I	0.069	0.580	0.069	536
フアージ -440	-	-	V	-	N	F	-	T	-	-	-	-	-	T	0.072	0.472	0.070	537
フアージ -441	-	-	A	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	Y	0.093	0.426	0.076	538
フアージ -442	T	-	T	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	-	0.065	0.422	0.065	539
フアージ -443	-	-	L	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	Y	0.084	0.397	0.079	540
フアージ -444	-	-	N	-	-	T	-	I	-	-	-	-	-	Y	0.078	0.254	0.077	541
フアージ -445	-	-	L	-	Q	F	-	T	-	-	-	-	-	L	0.120	0.218	0.086	542
フアージ -446	-	-	F	-	-	H	-	P	-	-	-	-	-	A	0.077	0.189	0.077	543
フアージ -447	-	-	T	-	-	T	-	I	-	-	-	-	-	-	0.094	0.165	0.090	544
フアージ -448	-	-	A	-	M	Y	-	D	-	-	-	-	-	H	0.078	0.137	0.074	545
フアージ -449	-	-	V	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.102	0.135	0.093	546
フアージ -450	-	-	N	-	L	Y	-	N	-	-	-	-	-	-	0.066	0.133	0.065	547
フアージ -451	-	-	L	-	L	N	-	P	-	-	-	-	-	T	0.076	0.126	0.074	548
フアージ -452	-	-	L	-	L	H	-	I	-	-	-	-	-	A	0.070	0.117	0.070	549
フアージ -453	T	-	S	L	Q	H	Q	Y	-	Y	-	M	-	I	0.114	0.105	0.146	550
フアージ -454	-	-	A	-	-	H	-	Y	-	-	-	-	-	T	0.081	0.087	0.069	551
フアージ -455	-	-	V	-	-	N	-	I	-	-	-	-	-	L	0.076	0.080	0.075	552
フアージ -456	M	-	H	P	Q	N	-	A	-	Y	-	F	-	D	0.091	0.075	0.107	553
フアージ -457	-	-	N	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	I	0.073	0.074	0.067	554

10

20

30

40

【 0 6 9 1】

50

【表 2 5 - 2 2】

フアージ -458	-	-	N	-	-	T	-	S	-	-	-	-	-	A	0.072	0.072	0.069	555
フアージ -459	L	-	H	P	Q	N	-	A	-	Y	-	M	-	D	0.076	0.072	0.088	556
フアージ -460	G	-	F	-	-	P	Q	N	-	H	-	S	-	F	0.073	0.069	0.077	557
フアージ -461	L	-	H	P	Q	F	-	F	-	Y	-	M	-	D	0.070	0.067	0.076	558
フアージ -462	W	-	H	P	Q	H	-	A	-	Y	-	F	-	S	0.068	0.066	0.073	559
フアージ -463	W	-	H	P	Q	F	-	Y	-	Y	-	M	-	D	0.071	0.065	0.078	560
フアージ -464	F	-	H	P	Q	N	-	I	-	Y	-	-	-	A	0.067	0.064	0.073	561
フアージ -465	-	-	V	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-	0.082	1.564	0.082	562
フアージ -466	-	-	N	-	F	T	-	T	-	-	-	-	-	A	0.074	2.351	0.074	563
フアージ -467	L	-	L	A	L	R	S	R	Q	A	D	L	-	R	0.072	2.482	0.072	564
フアージ -468	-	-	L	-	-	N	-	I	-	-	-	-	-	A	0.089	2.287	0.090	565
フアージ -469	-	-	L	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	I	0.067	2.426	0.068	566
フアージ -470	-	-	I	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	L	0.068	2.419	0.069	567
フアージ -471	-	-	L	Y	-	D	-	P	-	-	-	-	-	S	0.131	2.417	0.132	568
フアージ -472	-	-	L	-	N	Y	-	T	-	-	-	-	-	S	0.067	2.347	0.068	569
フアージ -473	-	-	S	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	L	0.078	2.569	0.079	570
フアージ -474	-	-	A	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	-	0.073	1.500	0.073	571
フアージ -475	-	-	V	-	-	N	-	I	-	-	-	-	-	A	0.093	1.127	0.093	572
フアージ -476	-	-	T	-	-	D	-	N	-	-	-	-	-	-	0.071	0.993	0.071	573
フアージ -477	-	-	T	-	L	V	-	-	-	-	-	-	-	L	0.067	2.455	0.069	574
フアージ -478	-	-	A	-	Q	F	-	L	-	-	-	-	-	T	0.065	2.367	0.067	575

【 0 6 9 2】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2 3】

フアージ -479	-	-	S	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	L	0.066	2.428	0.068	576
フアージ -480	-	-	T	-	L	H	-	P	-	-	-	-	-	A	0.076	2.589	0.078	577
フアージ -481	-	-	A	Y	-	G	-	N	-	-	-	-	-	L	0.071	2.556	0.073	578
フアージ -482	-	-	I	-	-	N	-	H	-	-	-	-	-	S	0.078	2.542	0.080	579
フアージ -483	-	-	L	Y	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	S	0.072	0.531	0.073	580
フアージ -484	-	-	S	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	0.069	2.426	0.071	581
フアージ -485	-	-	T	-	R	F	-	I	-	-	-	-	-	A	0.071	1.940	0.073	582
フアージ -486	-	-	L	-	P	N	-	I	-	-	-	-	-	A	0.091	1.291	0.092	583
フアージ -487	-	-	T	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	I	0.071	2.445	0.073	584
フアージ -488	-	-	S	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.073	2.388	0.075	585
フアージ -489	-	-	T	-	N	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.106	2.064	0.107	586
フアージ -490	-	-	S	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	T	0.105	2.314	0.107	587
フアージ -491	-	-	T	-	-	L	-	P	-	-	-	-	-	A	0.083	2.377	0.086	588
フアージ -492	-	-	A	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	I	0.066	2.513	0.068	589
フアージ -493	-	-	I	-	-	N	-	P	-	-	-	-	-	S	0.085	2.563	0.087	590
フアージ -494	-	-	L	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	L	0.074	2.534	0.077	591
フアージ -495	-	-	V	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	0.072	2.466	0.075	592
フアージ -496	-	-	L	-	-	F	-	A	-	-	-	-	-	I	0.110	2.253	0.113	593
フアージ -497	-	-	T	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	0.084	2.605	0.087	594
フアージ -498	-	-	V	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	I	0.115	2.249	0.117	595
フアージ -499	-	-	-	-	-	L	-	I	-	-	-	-	-	A	0.067	2.420	0.071	596

10

20

30

40

【 0 6 9 3】

50

【表 2 5 - 2 4】

フアージ -500	-	-	A	-	-	F	-	H	-	-	-	-	-	L	0.074	2.332	0.077	597
フアージ -501	-	-	T	-	L	F	-	N	-	-	-	-	-	A	0.074	2.278	0.077	598
フアージ -502	-	-	T	-	-	H	-	P	-	-	-	-	-	A	0.071	2.487	0.075	599
フアージ -503	-	-	A	-	-	T	-	N	-	-	-	-	-	A	0.076	1.934	0.079	600
フアージ -504	-	-	T	-	L	S	-	T	-	-	-	-	-	T	0.073	2.406	0.077	601
フアージ -505	-	-	I	-	-	S	-	T	-	-	-	-	-	I	0.103	1.750	0.106	602
フアージ -506	-	-	V	-	Q	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	0.073	2.406	0.077	603
フアージ -507	-	-	A	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	I	0.106	2.411	0.110	604
フアージ -508	-	-	L	-	R	F	-	-	-	-	-	-	-	T	0.068	2.030	0.071	605
フアージ -509	-	-	S	-	-	F	-	P	-	-	-	-	-	-	0.067	2.255	0.072	606
フアージ -510	-	-	N	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	I	0.081	2.466	0.085	607
フアージ -511	-	-	P	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.068	2.413	0.072	608
フアージ -512	-	-	L	-	-	T	-	I	-	-	-	-	-	A	0.069	2.453	0.074	609
フアージ -513	-	-	A	-	-	T	-	L	-	-	-	-	-	T	0.070	2.442	0.075	610
フアージ -514	-	-	I	-	P	H	-	L	-	-	-	-	-	S	0.068	0.963	0.070	611
フアージ -515	-	-	T	-	-	Y	-	F	-	-	-	-	-	I	0.066	2.224	0.070	612
フアージ -516	-	-	I	-	-	Y	-	N	-	-	-	-	-	L	0.072	2.240	0.076	613
フアージ -517	-	-	S	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.094	2.477	0.099	614
フアージ -518	-	-	N	-	L	S	E	T	-	-	-	-	-	-	0.082	2.453	0.088	615
フアージ -519	-	-	L	-	-	D	-	I	-	-	-	-	-	T	0.073	2.229	0.078	616
フアージ -520	-	-	T	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	0.065	2.170	0.070	617

10

20

30

40

【 0 6 9 4】

50

【表 2 5 - 2 5】

フアージ -521	-	-	A	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.081	2.451	0.086	618
フアージ -522	-	-	T	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	S	0.066	2.509	0.072	619
フアージ -523	-	-	N	-	R	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.063	1.794	0.067	620
フアージ -524	-	-	T	-	-	A	-	I	-	-	-	-	-	T	0.070	1.982	0.075	621
フアージ -525	-	-	L	-	R	F	-	T	-	-	-	-	-	I	0.072	2.517	0.079	622
フアージ -526	-	-	L	G	P	T	-	N	-	-	-	-	-	A	0.071	2.571	0.077	623
フアージ -527	-	-	T	-	Q	Y	-	-	-	-	-	-	-	A	0.071	2.441	0.077	624
フアージ -528	-	-	L	-	Q	F	-	I	-	-	-	-	-	A	0.068	1.852	0.073	625
フアージ -529	-	-	V	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	L	0.070	2.465	0.076	626
フアージ -530	-	-	S	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	I	0.071	2.421	0.078	627
フアージ -531	-	-	T	-	N	F	-	T	-	-	-	-	-	S	0.080	0.848	0.082	628
フアージ -532	-	-	L	-	-	T	-	N	-	-	-	-	-	I	0.063	2.493	0.069	629
フアージ -533	-	-	I	-	-	S	-	P	-	-	-	-	-	I	0.070	2.320	0.077	630
フアージ -534	-	-	L	-	-	L	-	T	-	-	-	-	-	A	0.069	2.432	0.076	631
フアージ -535	-	-	L	-	F	N	-	T	-	-	-	-	-	A	0.069	2.324	0.075	632
フアージ -536	-	-	N	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	I	0.067	1.804	0.072	633
フアージ -537	-	-	T	-	-	L	-	N	-	-	-	-	-	A	0.068	2.491	0.075	634
フアージ -538	-	-	A	-	-	Y	-	N	-	-	-	-	-	A	0.066	2.253	0.073	635
フアージ -539	-	-	T	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	-	0.064	2.207	0.070	636
フアージ -540	-	-	T	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	S	0.067	2.536	0.075	637
フアージ -541	-	-	L	-	L	V	-	T	-	-	-	-	-	I	0.068	2.505	0.076	638

10

20

30

40

【 0 6 9 5】

50

【表 2 5 - 2 6】

フアージ -542	-	-	L	-	L	F	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.596	0.081	639
フアージ -543	-	-	I	-	-	S	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.071	1.410	0.075	640
フアージ -544	-	-	I	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.068	1.927	0.075	641
フアージ -545	-	-	N	-	L	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.447	0.082	642
フアージ -546	-	-	L	F	-	H	-	P	-	-	-	-	-	-	N	0.070	2.269	0.078	643
フアージ -547	-	-	S	-	-	T	-	P	-	-	-	-	-	-	I	0.070	1.596	0.076	644
フアージ -548	-	-	N	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.066	2.530	0.075	645
フアージ -549	-	-	V	-	-	S	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.074	2.290	0.081	646
フアージ -550	-	-	N	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.071	2.585	0.080	647
フアージ -551	-	-	A	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	I	0.083	2.221	0.091	648
フアージ -552	-	-	L	-	L	N	-	N	-	-	-	-	-	-	-	0.070	2.273	0.078	649
フアージ -553	-	-	I	-	A	T	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.070	0.950	0.073	650
フアージ -554	-	-	A	F	L	N	-	P	-	-	-	-	-	-	S	0.068	2.580	0.078	651
フアージ -555	-	-	L	-	P	T	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.068	0.956	0.071	652
フアージ -556	-	-	T	-	-	H	-	Y	-	-	-	-	-	-	L	0.070	2.403	0.079	653
フアージ -557	-	-	A	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	I	0.073	2.576	0.083	654
フアージ -558	-	-	T	-	P	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.068	2.333	0.077	655
フアージ -559	-	-	L	-	-	V	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.073	2.465	0.082	656
フアージ -560	-	-	V	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	L	0.076	2.392	0.085	657
フアージ -561	-	-	A	-	-	Y	-	P	-	-	-	-	-	-	S	0.066	2.137	0.074	658
フアージ -562	-	-	S	-	Q	F	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.069	2.455	0.079	659

10

20

30

40

【 0 6 9 6】

50

【表 2 5 - 2 7】

フアージ -563	-	-	L	-	-	N	-	N	-	-	-	-	-	L	0.069	2.460	0.079	660
フアージ -564	-	-	L	-	L	L	-	T	-	-	-	-	-	I	0.082	2.213	0.091	661
フアージ -565	-	-	T	-	L	F	-	I	-	-	-	-	-	-	0.068	2.597	0.079	662
フアージ -566	-	-	A	-	-	Y	-	S	-	-	-	-	-	T	0.085	1.380	0.091	663
フアージ -567	-	-	V	-	L	L	-	T	-	-	-	-	-	I	0.069	2.333	0.079	664
フアージ -568	-	-	T	-	-	F	-	D	-	-	-	-	-	A	0.069	2.414	0.080	665
フアージ -569	-	-	A	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	L	0.071	2.498	0.082	666
フアージ -570	-	-	L	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	T	0.065	2.565	0.076	667
フアージ -571	-	-	L	-	Q	Y	-	I	-	-	-	-	-	L	0.118	2.285	0.128	668
フアージ -572	-	-	L	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	L	0.071	2.496	0.082	669
フアージ -573	-	-	L	-	-	F	-	D	-	-	-	-	-	S	0.119	2.388	0.130	670
フアージ -574	-	-	A	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	T	0.069	2.582	0.081	671
フアージ -575	-	-	L	-	F	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.071	2.478	0.083	672
フアージ -576	-	-	T	-	Q	F	-	T	-	-	-	-	-	A	0.065	2.577	0.078	673
フアージ -577	-	-	L	-	-	Y	-	Y	-	-	-	-	-	S	0.089	1.403	0.096	674
フアージ -578	-	-	P	F	L	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.071	2.465	0.083	675
フアージ -579	-	-	N	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	0.081	2.294	0.092	676
フアージ -580	-	-	N	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	L	0.073	2.412	0.085	677
フアージ -581	-	-	N	-	-	F	-	H	-	-	-	-	-	I	0.072	2.289	0.084	678
フアージ -582	-	-	L	-	Q	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.074	2.498	0.087	679
フアージ -583	-	-	A	-	-	T	-	T	-	-	-	-	-	S	0.075	1.392	0.082	680

10

20

30

40

【 0 6 9 7 】

50

【表 2 5 - 2 8】

フアージ -584	-	-	S	-	Q	F	-	I	-	-	-	-	-	-	A	0.081	0.877	0.085	681
フアージ -585	-	-	H	-	L	F	-	L	-	-	-	-	-	-	A	0.068	0.178	0.069	682
フアージ -586	-	-	L	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	A	0.066	2.605	0.080	683
フアージ -587	-	-	L	-	L	H	-	P	-	-	-	-	-	-	-	0.070	1.851	0.080	684
フアージ -588	-	-	I	-	L	D	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.072	1.357	0.079	685
フアージ -589	-	-	V	-	-	L	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.074	2.463	0.088	686
フアージ -590	-	-	N	-	L	F	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.073	2.367	0.086	687
フアージ -591	-	-	N	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	-	S	0.066	2.419	0.079	688
フアージ -592	-	-	L	-	-	L	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.129	2.446	0.143	689
フアージ -593	-	-	A	-	-	H	-	S	-	-	-	-	-	-	-	0.071	2.599	0.086	690
フアージ -594	-	-	T	-	-	F	-	H	-	-	-	-	-	-	L	0.073	2.488	0.087	691
フアージ -595	-	-	L	-	L	H	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.068	2.596	0.083	692
フアージ -596	-	-	L	-	-	N	-	H	-	-	-	-	-	-	T	0.069	2.505	0.084	693
フアージ -597	-	-	S	-	-	F	-	A	-	-	-	-	-	-	Y	0.075	2.447	0.089	694
フアージ -598	-	-	T	-	-	T	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.071	2.576	0.087	695
フアージ -599	-	-	V	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.072	2.064	0.084	696
フアージ -600	-	-	L	-	L	V	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.072	1.402	0.080	697
フアージ -601	-	-	A	-	P	F	-	L	-	-	-	-	-	-	S	0.080	1.785	0.092	698
フアージ -602	-	-	I	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	-	N	0.071	1.154	0.078	699
フアージ -603	-	-	L	-	F	T	-	P	-	-	-	-	-	-	A	0.075	2.448	0.091	700
フアージ -604	-	-	N	-	Q	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	L	0.068	2.259	0.083	701

10

20

30

40

【 0 6 9 8】

50

【表 2 5 - 2 9】

フアージ -605	-	-	I	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	L	0.068	2.443	0.085	702
フアージ -606	-	-	T	-	-	H	-	H	-	-	-	-	-	-	L	0.067	2.506	0.085	703
フアージ -607	-	-	A	-	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	S	0.067	2.453	0.085	704
フアージ -608	-	-	T	-	-	H	-	D	-	-	-	-	-	-	A	0.072	1.237	0.080	705
フアージ -609	-	-	A	-	R	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	-	0.072	1.337	0.081	706
フアージ -610	-	-	N	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	-	A	0.075	2.358	0.093	707
フアージ -611	-	-	A	-	-	H	-	L	-	-	-	-	-	-	-	0.069	1.799	0.083	708
フアージ -612	-	-	V	-	F	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.068	2.489	0.088	709
フアージ -613	-	-	T	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	-	-	0.070	2.289	0.088	710
フアージ -614	-	-	I	-	Q	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.094	2.107	0.111	711
フアージ -615	-	-	L	-	-	H	-	P	-	-	-	-	-	-	H	0.089	2.055	0.105	712
フアージ -616	-	-	T	-	-	A	-	T	-	-	-	-	-	-	A	0.070	1.392	0.080	713
フアージ -617	-	-	L	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.076	2.166	0.094	714
フアージ -618	-	-	L	-	P	H	-	I	-	-	-	-	-	-	A	0.077	2.354	0.096	715
フアージ -619	-	-	T	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	-	I	0.067	2.586	0.089	716
フアージ -620	-	-	T	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	-	T	0.074	0.454	0.078	717
フアージ -621	-	-	L	-	P	Y	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.070	1.177	0.080	718
フアージ -622	-	-	I	-	L	S	-	P	-	-	-	-	-	-	-	0.072	2.281	0.092	719
フアージ -623	-	-	L	-	-	Y	-	I	-	-	-	-	-	-	I	0.079	2.302	0.099	720
フアージ -624	-	-	V	-	-	Y	-	H	-	-	-	-	-	-	L	0.093	2.448	0.115	721
フアージ -625	-	-	T	-	-	H	-	N	-	-	-	-	-	-	A	0.077	2.600	0.101	722

【 0 6 9 9】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 3 0】

フアージ -626	-	-	T	-	-	Y	-	N	-	-	-	-	-	T	0.070	2.248	0.091	723
フアージ -627	-	-	I	-	P	F	-	T	-	-	-	-	-	Y	0.074	2.357	0.097	724
フアージ -628	-	-	T	-	P	F	-	-	-	-	-	-	-	L	0.119	2.272	0.141	725
フアージ -629	-	-	L	-	-	T	-	L	-	-	-	-	-	I	0.077	2.071	0.097	726
フアージ -630	-	-	V	-	Q	H	-	T	-	-	-	-	-	A	0.070	0.213	0.072	727
フアージ -631	-	-	A	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	A	0.074	2.132	0.096	728
フアージ -632	-	-	V	-	-	F	-	H	-	-	-	-	-	-	0.083	0.839	0.091	729
フアージ -633	-	-	L	-	N	F	-	P	-	-	-	-	-	I	0.078	1.955	0.099	730
フアージ -634	L	-	L	A	S	R	Y	R	Q	A	D	L	-	R	0.071	0.641	0.078	731
フアージ -635	-	-	H	-	P	F	-	D	-	-	-	-	-	A	0.066	0.345	0.070	732
フアージ -636	-	-	I	-	-	N	-	N	-	-	-	-	-	T	0.068	1.430	0.084	733
フアージ -637	-	-	V	-	-	Y	-	T	-	-	-	-	-	L	0.072	0.496	0.077	734
フアージ -638	-	-	L	-	L	D	-	P	-	-	-	-	-	-	0.077	1.281	0.092	735
フアージ -639	-	-	H	-	-	F	-	S	-	-	-	-	-	S	0.070	1.420	0.087	736
フアージ -640	-	-	L	-	Q	T	-	-	-	-	-	-	-	A	0.074	1.644	0.094	737
フアージ -641	-	-	T	-	P	Y	-	P	-	-	-	-	-	A	0.113	1.701	0.133	738
フアージ -642	-	-	H	-	-	H	-	N	-	-	-	-	-	A	0.067	1.062	0.080	739
フアージ -643	-	-	V	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	A	0.065	1.098	0.080	740
フアージ -644	-	-	V	-	-	H	-	T	-	-	-	-	-	L	0.083	0.335	0.087	741
フアージ -645	-	-	S	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	L	0.067	0.696	0.076	742
フアージ -646	-	-	I	-	-	F	-	T	-	-	-	-	-	T	0.070	0.882	0.082	743

10

20

30

40

【 0 7 0 0】

50

【表 2 5 - 3 1】

フアージ	-	-	I	-	-	D	-	P	-	-	-	-	-	T	0.090	0.642	0.100	744
フアージ	-	-	L	-	-	D	-	I	-	-	-	-	-	-	0.081	0.847	0.096	745
フアージ	-	-	L	-	-	N	-	L	-	-	-	-	-	A	0.069	0.713	0.082	746
フアージ	-	-	T	-	Q	T	-	T	-	-	-	-	-	I	0.064	1.454	0.108	747
フアージ	-	-	N	-	-	F	-	L	-	-	-	-	-	I	0.111	0.134	0.112	748
フアージ	-	-	A	F	L	N	-	P	-	-	-	-	-	A	0.067	0.469	0.081	749
フアージ	-	-	H	-	-	S	-	T	-	-	-	-	-	-	0.084	0.153	0.086	750
フアージ	-	-	L	-	Q	Y	-	I	-	-	-	-	-	I	0.082	0.411	0.096	751
フアージ	-	-	T	-	Q	Y	-	-	-	-	-	-	-	T	0.075	0.309	0.085	752
フアージ	-	-	I	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	T	0.079	0.299	0.091	753
フアージ	-	-	T	-	-	S	-	T	-	-	-	-	-	T	0.069	0.287	0.084	754
フアージ	-	-	L	-	-	F	-	N	-	-	-	-	-	L	0.076	0.167	0.087	755
フアージ	-	-	T	G	P	S	E	N	-	-	-	-	-	A	0.076	0.206	0.092	756
フアージ	-	-	I	-	Q	Y	-	T	-	-	-	-	-	A	0.065	0.113	0.071	757
フアージ	F	-	H	P	Q	F	-	H	-	Y	-	N	-	Y	0.107	0.081	0.103	758
フアージ	-	-	T	-	L	Y	-	S	-	-	-	-	-	-	0.069	0.126	0.083	759
フアージ	-	-	T	-	-	L	-	T	-	-	-	-	-	T	0.089	0.110	0.094	760
フアージ	-	-	H	P	Q	F	H	A	-	Y	-	-	-	D	0.111	0.079	0.103	761
フアージ	-	-	T	-	L	Y	-	T	-	-	-	-	-	H	0.066	0.088	0.074	762
フアージ	L	-	H	P	Q	N	-	T	-	Y	-	-	-	D	0.118	0.097	0.110	763
フアージ	-	-	L	-	R	F	-	H	-	-	-	-	-	T	0.094	0.073	0.085	764

【 0 7 0 1】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 3 2】

ファージ -668	-	-	T	-	M	V	-	S	-	-	-	-	-	T	0.071	0.106	0.089	765
ファージ -669	F	-	H	P	Q	A	-	I	-	Y	-	L	-	N	0.098	0.077	0.086	766
ファージ -670	-	-	H	P	Q	F	H	P	-	Y	-	L	-	D	0.097	0.079	0.086	767
ファージ -671	-	-	L	F	-	N	-	I	-	-	-	-	-	A	0.114	0.150	0.144	768
ファージ -672	S	-	H	P	Q	A	-	I	-	Y	-	Y	-	D	0.083	0.070	0.071	769
ファージ -673	-	-	A	-	-	V	-	L	-	-	-	-	-	T	0.123	0.110	0.111	770
ファージ -674	-	-	V	-	-	N	-	T	-	-	-	-	-	S	0.130	0.116	0.114	771
ファージ -675	-	-	A	-	-	L	-	P	-	-	-	-	-	L	0.122	0.113	0.086	772
ファージ -676	-	-	I	-	L	T	-	T	-	-	-	-	-	I	0.070	0.091	0.092	773
ファージ -677	L	-	H	P	Q	A	-	I	-	F	-	F	-	N	0.069	0.073	0.075	774
ファージ -678	F	-	H	P	Q	N	-	S	-	Y	-	-	-	D	0.074	0.072	0.068	775
ファージ -679	L	-	H	P	Q	S	-	I	-	Y	-	F	-	D	0.066	0.071	0.072	776

10

20

【0 7 0 2】

6 7 9のクローンファージのうち、2 0をペプチド合成について選択し、E G F R F a bの結合および阻害について評価した。合成のために選択されたペプチドの配列を表 2 3に示す。E F I S Aによって測定したE G F R F a bへのペプチドの結合についての結合曲線を図 2 1～2 2に示し、ペプチドー8およびE G F R-B i oに対するE C₅₀sを表 2 4～2 5に示す。図 2 3～2 4は、E F I S Aによって測定される、ペプチドによるE G F R抗原へのE G F R F a b結合の用量依存的阻害を示す。ペプチドー8に対するペプチドによる結合阻害についてのI C₅₀データを表 2 6～2 7に提供する。結合および阻害データは、ファージライブラリーがペプチドー4 5およびペプチドー4 6などのより強力なペプチドマスクを同定したことを実証する。

30

【0 7 0 3】

40

50

【表 2 6 - 1】

表 2 3。合成のために選択されるペプチド配列（EGFR Fab ペプチド-8 最適化）

詳細	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
ペプチド-29	PCLSPFDTAKPICA	99
ペプチド-30	PCTSHFDTAKPICT	100
ペプチド-31	PCTSHFDTAKPICI	101
ペプチド-32	PCLSHFDTAKPICL	102
ペプチド-33	PCLSHTDTAKPICA	103
ペプチド-34	PCLSHHDTAKPICA	104
ペプチド-35	PCLSHFDTAKPICA	105
ペプチド-36	PCLSHFDTAKPICV	106
ペプチド-37	PCLSHNDPAKPICS	107
ペプチド-38	PCTSQHDTAKPICI	108
ペプチド-39	PCTSHFDTAKPICA	109
ペプチド-40	PCLSHTDTAKPICV	110
ペプチド-41	PCLSHNDPAKPICA	111
ペプチド-42	PCLSHYDTAKPICA	112
ペプチド-43	PCNSHYDLAKPICT	113
ペプチド-44	PCNSHFDIAKPICL	114
ペプチド-45	PCAYHNDPAKPICS	115

【 0 7 0 4】

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 2】

ペプチド-46	PCLFHFDPAKPICS	116
ペプチド-47	PCTSHFDPAKPICA	117
ペプチド-48	PCTSHNDNAKPICA	118

10

【 0 7 0 5】

【表 2 7】

表 2 4。αEGFR Fab へのペプチド結合についての EC₅₀s

ペプチド	EC ₅₀ (nM)
EGFR-Bio (3nM)	0.17
ペプチド-8	699.6
ペプチド-29	150.6
ペプチド-30	194.0
ペプチド-31	171.8
ペプチド-32	66.55
ペプチド-33	340.2
ペプチド-34	377.5
ペプチド-35	149.2
ペプチド-36	154.2
ペプチド-37	358.0
ペプチド-38	1294

20

30

【 0 7 0 6】

40

50

【表 2 8】

表 2 5。αEGFR Fab へのペプチド結合についての EC₅₀S

ペプチド	EC ₅₀ (nM)
EGFR-Bio (3nM)	0.17
ペプチド-8	340.3
ペプチド-39	206.2
ペプチド-40	413.7
ペプチド-41	292.2
ペプチド-42	63.58
ペプチド-43	186.4
ペプチド-44	340.9
ペプチド-45	10.3
ペプチド-46	4.9
ペプチド-47	379.9
ペプチド-48	536

10

20

【0 7 0 7】

【表 2 9】

表 2 6。EGFR 抗原へのαEGFR Fab 結合のペプチド阻害についての IC₅₀S

ペプチド	IC ₅₀ (μM)
ペプチド-8	7.76
ペプチド-29	2.08
ペプチド-30	4.55
ペプチド-31	3.72
ペプチド-32	2.08
ペプチド-33	2.30
ペプチド-34	4.91
ペプチド-35	2.22
ペプチド-36	1.97
ペプチド-37	4.16
ペプチド-38	29.9

30

40

【0 7 0 8】

50

【表 3 0】

表 2 7. EGFR 抗原への α EGFR Fab 結合のペプチド阻害についての IC_{50} S

ペプチド	IC_{50} (μ M)
ペプチド-8	6.29
ペプチド-39	2.79
ペプチド-40	2.66
ペプチド-41	4.25
ペプチド-42	2.22
ペプチド-43	4.23
ペプチド-44	6.57
ペプチド-45	0.543
ペプチド-46	0.300
ペプチド-47	6.25
ペプチド-48	8.03

10

20

【0 7 0 9】

実施例 1 3. 大腸癌のマウスモデル中の抗腫瘍有効性

雌マウスに、50%マトリゲル中の500万のHCT116大腸腫瘍細胞を皮下移植した。2000万のヒトPBMCを、HCT116接種と同日に尾静脈を介して生着させた。腫瘍が250mm³に達したら、マウスを無作為に群分けし、化合物を10日間毎日静脈内投与した。腫瘍体積を2~3日毎に測定し、経時的にプロットした。腫瘍体積増殖動態は、マスクされたEGFR標的ニ重特異性化合物の抗腫瘍活性を示す。観察された抗腫瘍活性は、切断可能なリンカー内にプロテアーゼ基質を欠く化合物がビヒクル対照と同等であるという点で、プロテアーゼ依存性であった。図25~28は、PC1（図25）、PC5（図26）、PC7（図27）、およびPC6（図28）の異なる投与量でのインビボ腫瘍増殖阻害データを示す。

30

【0 7 1 0】

実施例 1 4. ヒトおよびカニクイザルのCD3 ϵ 、EGFR、およびアルブミンへのPC1およびPC4の結合

ポリペプチド複合体PC1およびPC4を、ヒトおよびカニクイザルのCD3 ϵ 、EGFR、およびアルブミンへの結合について、ELISAによって評価した。簡潔には、ビオチン化抗原をニュートラアビジンでコーティングしたプレート上に捕捉した。指示があれば、ポリペプチド複合体分子を活性プロテアーゼで処置した。次いで、緩衝液中で希釈したポリペプチド複合体分子を、抗原でコーティングしたプレートに添加した。結合したポリペプチド複合体を、標準的な西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を用いて検出した。結合曲線を、Graphpad Prismソフトウェアを用いてフィッティングした。ヒトおよびカニクイザルのCD3 ϵ へのPC1およびPC4結合についての結合曲線を、それぞれ図29および30に示す。ヒトおよびカニクイザルのEGFRへのPC1およびPC4結合についての結合曲線を、それぞれ図31および32に示す。曲線から分かるように、マスクングによりCD3 ϵ およびEGFR結合がそれぞれ1000倍超および300倍超減少するため、標的結合(target engagement)は切断依存性である。プロテアーゼ酵素を用いたPC4の処置は、マスクされていないPC1に匹敵する強力な抗原結合を可能にする。ヒトおよびカニクイザルのアルブミンへ

40

50

のPC4結合についての結合曲線を、それぞれ図33および34に示す。図から分かるように、PC4は、ヒトアルブミンおよびサルアルブミンの両方への強力な結合を示す。

【0711】

実施例15。ポリペプチド複合体によって媒介された腫瘍の細胞毒性およびT細胞活性化(A549細胞)

ポリペプチド複合体を、EGFR陽性腫瘍細胞株であるA549を使用する機能的インビトロ腫瘍細胞死滅アッセイにおいて評価した。腫瘍細胞死滅は、腫瘍細胞がセンサーの表面に付着し、広がり、拡大するにつれて増加したセンサーインピーダンス測定値(細胞指数)に依存するAgilent製のxCelligenceリアルタイム細胞アナライザーを用いて測定した。同様に、腫瘍細胞が死滅するにつれて、インピーダンスは減少した。腫瘍細胞を各ウェルに添加し、96ウェルE-プレート上に一晚付着させた。翌日、ヒト血清補充培地中でヒトPBMCと共に滴定したポリペプチド複合体をウェルに添加した。細胞指数測定を10分毎にさらに72時間行った。次いで、細胞指数×時間数(腫瘍細胞増殖動態)をポリペプチド複合体の対数(logarithmic)濃度に対してプロットし、ここで、Graphpad Prismソフトウェアを使用して、腫瘍増殖50%を減少させるのに必要な濃度(IC₅₀)を算出した。図35は、PBMCの存在下におけるPC1およびPC4によって媒介されたA549腫瘍細胞死滅のグラフを示す。指示があれば、PC4を、プロテアーゼで処置した。プロテアーゼ処置によって、PC4の活性が、未処置のPC4と比べて約43000倍増加した。プロテアーゼで処置したPC4の活性レベルは、マスクされていないPC1の活性レベルに匹敵した(図35を参照)。

10

20

【0712】

実施例16。インビトロサイトカイン誘導アッセイにおけるポリペプチド複合体の評価

ポリペプチド複合体PC1およびPC4を、EGFR陽性腫瘍細胞株HCT116(大腸癌(CRC)細胞-KRASおよびPIK3CA突然変異体)およびA549(非小細胞肺癌(NSCLC)細胞-KRAS突然変異体)を使用する機能的インビトロサイトカイン誘導アッセイにおいて評価した。T細胞サイトカイン誘導を、Meso Scale Discovery(MSD)電気化学発光機器を使用して測定した。腫瘍細胞をウェルに添加し、96ウェル上に一晚付着させた。翌日、ポリペプチド複合体をヒト血清補充培地中でヒトPBMCと共に滴定した。72時間後に上清を回収し、サイトカインレベル(インターフェロンγ(IFNγ)および腫瘍壊死因子(TNF))を測定した。次いで、サイトカインレベルをポリペプチド複合体の対数濃度に対してプロットし、最大の50%を誘導するのに必要な濃度(EC₅₀)を、Graphpad Prismソフトウェアを使用して算出した。図36~39は、HCT116細胞(図36~37)およびA549細胞(図38~39)におけるPC1およびPC4の濃度の増加に伴うサイトカインレベルを示す。PC4は、指示があれば、プロテアーゼで処理した。PC4 EGFRおよびCD3結合ドメインのマスキングは、サイトカイン放出を誘導する能力を低下させる。さらに、T細胞共培養アッセイにおけるKRAS突然変異体抗EGFR耐性CRCおよびNSCLC細胞株に対する機能活性は、切断依存性であることが見出された。プロテアーゼ処理PC4は、マスクされていないPC1に対して同様の効力を示す。

30

40

【0713】

実施例17。HCT116マウス腫瘍モデルにおける活性

ポリペプチド複合体をマウス腫瘍モデル研究において評価した。雌マウスに、50%マトリゲル中の500万のHCT116大腸腫瘍細胞を皮下移植した。2000万のヒトPBMCを、HCT116接種と同日に尾静脈を介して生着させた。腫瘍が250mm³に達したら、マウスを無作為に群分けし、化合物を10日間毎日静脈内投与した(図40を参照)。腫瘍体積を2~3日毎に測定し、経時的にプロットした。腫瘍体積増殖動態は、マスクされたEGFR標的ニ重特異性化合物の抗腫瘍活性が、マスクされていない化合物の抗腫瘍活性と同様であることを示す。観察された抗腫瘍活性は、切断可能なリンカー内のプロテアーゼ基質を欠く化合物(切断不可能)がビヒクル対照と等価であるという点で

50

、プロテアーゼ依存性であった。生存プロットは、研究において生存したマウスの数対時間に基づいて作成した。図41は、PC1 (0.5 mg/kg)、PC7 (0.5 mg/kg)、非切断性PC6 (0.5 mg/kg)、およびビヒクル処置マウスについての処置日数に対する平均腫瘍体積のプロットを示す。図42は、ビヒクルおよびPC5処置マウスについての腫瘍体積に対する処置日数のプロットを示す。PC1 (0.5 mg/kg)、PC5 (0.5 mg/kg)、非切断性PC6 (0.5 mg/kg)、およびビヒクルによる処置の日数に対するマウスの生存率を図43に示す。同等の用量レベルでの切断可能なPC7およびPC1は、抗EGFR耐性KRASおよびPIK3CA突然変異体HCT116ヒト腫瘍細胞を移植したヒトPBM C生着マウスにおいて完全な腫瘍根絶を誘導することが見出された (図41を参照)。

10

【0714】

実施例18。ヒト大腸癌 (CRC) オルガノイドにおける切断依存活性

新鮮な腫瘍組織を大腸癌患者から得て、その下にある免疫コンパートメントまたは腫瘍微小環境を破壊することなく小さな三次元腫瘍オルガノイドに分離し、96ウェルプレートに分配した。新鮮な腫瘍オルガノイドをポリペプチド複合体で処理し、培養物中で24~72時間維持した (図44を参照)。研究の最後に、腫瘍オルガノイドを消化し、細胞マーカーCD25、CD69、4-1 BBおよびグランザイム-B (GzB) に結合する蛍光標識抗体を用いて染色した。染色した細胞をフローサイトメトリーによって泳動し、蛍光シグナルを生細胞に対してゲートした。所与のマーカーについての陽性染色細胞のパーセントを、各ポリペプチド処理条件についてプロットした。図45を参照すると、CD25、CD69、4-1 BBおよびグランザイムのアップレギュレーションはプロテアーゼ切断依存性であり、切断可能な基質を欠くポリペプチド複合体PC6 (切断不可能) は不活性であり、ビヒクル対照と等価であった。切断可能かつマスクされていないポリペプチド複合体は活性であり、これらの原発性ヒト大腸癌腫瘍オルガノイドにおける腫瘍常在免疫コンパートメント内で活性化マーカーを誘導することができた (図45を参照)。さらに、PC5の濃度依存性活性が観察された (図45を参照)。

20

【0715】

実施例19。非ヒト霊長類 (NHP) 毒性研究

ポリペプチド分子PC1およびPC4の薬物動態および探索的安全性を、カニクイザルにおいて評価した。簡潔には、体重約3 kgのカニクイザルにポリペプチドをIVボラスとして3週間毎週1回、または連続IV注入により投与した。動物を有害事象の徴候について毎日観察した。PC1を5 μg/kg/日、15 μg/kg/日、および30 μg/kg/日で連続IV (cIV) 注入により投与した。0.1 mg/kg/用量、0.3 mg/kg/用量、および0.6 mg/kg/用量の投与量を、IVボラス注射を介してPC4に使用した。投与後、血液を特定の時点でK2 EDTAチューブに採取し、血漿に処理した。分析まで血漿を凍結保存した。血漿中のポリペプチド分子の濃度を、標準ELISA技術を介して、対照カニクイザル血漿中に希釈した参照標準に対して測定した。マスクされたポリペプチド複合体PC4について動物において達成された最大血漿濃度を、マスクされていないポリペプチド複合体PC1を用いて達成されたものと比較した。マスクされていないポリペプチド複合体の最大許容血漿濃度と比較した、マスクされたポリペプチド複合体で達成された最大血漿濃度の比較は、>3000×倍数を示した (図46~47を参照)。マスクされたポリペプチド複合体は、試験した最高用量0.6 mg/kg/用量で動物において有害事象を有さなかった (図46を参照)。マスクされていないポリペプチド複合体PC1の最大耐量 (MTD) は、連続IV注入により15 μg/kg/日であった。30 μg/kg/日のマスクされていないポリペプチド複合体の連続IV注入を投与された動物は、重篤な有害事象のために耐受性を示さなかった (図46を参照)。PC4毒性研究は、その薬物動態、安全性、および設計の増強を支持する。特に、3週間にわたって週1回投与されたPC4は、臨床的観察または臨床化学、血液学もしくは病理における顕著な変化なしに良好な耐受性を示した。対照的に、15 μg/kg/日の連続IV注入によって投与されたPC1は、体温を増加させ、肝酵素を増加させた。動

30

40

50

物における発熱、皮膚発疹、GI毒性、および応答性の欠如を含む重篤な有害事象のために、連続IV注入による $30\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ のPC1での処置は、投与の24時間後に終了しなければならなかった（図46を参照）。臨床観察、体温、および臨床病理測定は、非マスクPC1に対するPC4の大きな安全倍数（ $>3,000\times$ ）を支持する。PC4は、EGFRの広範な組織発現にもかかわらず、カニクイザルにおいて高曝露でサイトカイン放出および健康組織毒性（GI、肝臓、皮膚）を低減することが見出された。PC4のNOAEL（有害作用レベルが観察されない）は、 $>0.6\text{mg}/\text{kg}/\text{用量}$ での3週間毎週のIVボラス投与である（図46を参照）。

【0716】

実施例20：PC10およびPC11のEGFRポリペプチド複合体結合

10

EGFR-CD3ポリペプチド複合体をEGFRおよびCD3ε結合について評価した。

【0717】

簡潔には、ポリペプチド複合体分子を、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）フォーマットでEGFRおよびCD3に結合するそれらの能力について評価した。EGFRまたはCD3のポリペプチド複合体結合をプロテアーゼ処置の前後に測定した。簡潔には、ビオチン化抗原をニュートラアビジンでコーティングしたプレート上に捕捉した。指示があれば、ポリペプチド複合体分子を活性マトリプターゼを用いて処置した。次いで、緩衝液中で希釈したポリペプチド複合体分子を、抗原でコーティングしたプレートに添加した。結合したポリペプチド複合体を、標準的な西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体を用いて検出した。50%最大シグナルを達成するのに必要なポリペプチド複合体の濃度（EC50）を、Graphpad Prismソフトウェアを用いて算出した。

20

【0718】

図48は、ELISAによって測定されたEGFRに結合するPC10およびPC11を示す。

【0719】

図49は、ELISAによって測定されたCD3に結合するPC10およびPC11を示す。

【0720】

30

実施例21：PC10およびPC11によって媒介された腫瘍の細胞毒性とT細胞活性化
ポリペプチド複合体PC10およびPC11をEGFR陽性腫瘍細胞株であるHCT116を使用して機能的インビトロ腫瘍細胞死滅アッセイにおいて評価した。腫瘍細胞死滅は、腫瘍細胞がセンサーの表面に付着し、広がり、拡大するにつれて増加したセンサーインピーダンス測定値（細胞指数）に依存するAgilent製のxCelligenceリアルタイム細胞アナライザーを用いて測定した。同様に、腫瘍細胞が死滅するにつれて、インピーダンスは減少した。10000腫瘍細胞をウェル毎に添加し、96ウェルプレート上に一晚付着させた。翌日、ヒト血清補充培地中で滴定したポリペプチド複合体を30000CD8+T細胞と共にウェルに添加した。細胞指数測定を10分毎にさらに72時間行った。次いで、細胞指数×数時間（腫瘍細胞増殖動態）をポリペプチド複合体の濃度に対してプロットし、ここで、Graphpad Prismソフトウェアを使用して、腫瘍増殖50%を減少させるのに必要な濃度（IC50）を算出した。

40

【0721】

図50は、CD8+T細胞の存在下でのPC10およびPC11によって媒介されたHCT116腫瘍細胞死滅のグラフを示す。

【0722】

実施例22。最適化されたファージライブラリー構造-CD3 scFvペプチド

ペプチド内の各個々の残基をアラニンに変異させ、SP34.185 scFvに対する結合および阻害を測定することによって、ペプチド-Aおよびペプチド-Bについて配列活性関係（SAR）を確立した。アラニン変異が結合および阻害を有意に弱体化させた

50

ペプチド残基は、変異が許容されなかった重要な残基とみなすことができる。アラニン変異が非変異配列と同様に生じたペプチド残基は、変異が実際に許容された重要でない部位とみなすことができる。ペプチドSARを使用して、DNAオリゴライブラリーが構築され、ここで、各ペプチド配列内の重要な残基をコードするコドンをもっと突然変異させ、重要でない残基をコードするコドンを大幅に突然変異させた。得られたオリゴを、バクテリオファージのp i l lフィラメントへの融合を介してSAR誘導ペプチドを提示するために使用されるバクテリオファージベクターにクローン化した。その後、関連するベクターを用いて、当該分野における標準的な技術を用いた細菌における増幅を介してファージ最適化ライブラリーを作製した。

【0723】

標準的な酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって、SP34.185 scFvに結合する能力についてペプチドを評価した。簡潔には、ビオチン化ペプチドをニュートラアビジンでコーティングしたプレート上に捕捉し、ビオチンでクエンチし、その後、洗浄工程を行った。その後、SP34.185 scFvをペプチド捕捉プレート上に滴定した。次いでプレートを洗浄し、二次西洋ワサビペルオキシダーゼ抗体コンジュゲートを用いて、結合したSP34.185 scFvを検出した。再度洗浄した後、標準的なELISA技術を用いてプレートを発色させ、酸を用いて停止させた。50%最大シグナルまたはEC₅₀を達成するのに必要なSP34.185 scFvの濃度を、Graphpadプリズムを用いて算出した。データを図51A～51Fに示し、表28A～28Dに要約する。ペプチド-Aおよびペプチド-BのためのCD3アラニンスキャンペプチドのペプチド配列を表30に示す。

【0724】

【表31A】

表28A。図51Bの要約

ELISA	ペプチド-A	ペプチド-C	ペプチド-D	ペプチド-E	ペプチド-F	ペプチド-G	ペプチド-H
EC ₅₀ nM	1.013	0.9429	1.018	0.9738	1.27	47.5	346.2

【0725】

【表31B】

表28B。図51Cの要約

ELISA	ペプチド-A	ペプチド-I	ペプチド-J	ペプチド-K	ペプチド-L	ペプチド-M	ペプチド-N
EC ₅₀ nM	0.986	310.8	3.134	1,960	4.363	2.76	1.546

【0726】

【表31C】

表28C。図51Eの要約

ELISA	ペプチド-O	ペプチド-P	ペプチド-Q	ペプチド-R	ペプチド-S	ペプチド-T
EC ₅₀ nM	1.356	2.359	30.04	47.50	457.1	4.762

【0727】

【表 3 1 D】

表 2 8 D。図 5 1 F の要約

ELISA	ペプチド-U	ペプチド-V	ペプチド-W	ペプチド-X	ペプチド-Y	ペプチド-Z
EC ₅₀ nM	39.90	2168	1.916	1.948	2.012	1.833

【0 7 2 8】

標準的な酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって、SP34.185 scFv が CD3e に結合するのを防ぐ能力についてペプチドを評価した。簡潔には、固定された濃度の SP34.185 scFv を、溶液中の様々な濃度のペプチドとインキュベートした。SP34.185 scFv とペプチドの溶液を 1 時間インキュベートし、その後、CD3 コーティングプレートに添加した。洗浄の前に 30 分間、結合を進めた。洗浄後、二次西洋ワサビペルオキシダーゼ抗体コンジュゲートを用いて、結合した SP34.185 scFv をした。再度洗浄した後、標準的な ELISA 技術を用いてプレートを発色させ、酸を用いて停止させた。SP34.185 scFv CD3 結合シグナル（IC₅₀）の 50% を阻害するために必要とされたペプチドの濃度を、Graphpad プリズムを使用して算出した。データを図 5 2 A ～ 5 2 F に示し、表 2 9 A ～ 2 9 D に要約する。

【0 7 2 9】

【表 3 2 A】

表 2 9 A。図 5 2 B の要約

ELISA	ペプチド-A	ペプチド-C	ペプチド-D	ペプチド-E	ペプチド-F	ペプチド-G	ペプチド-H
IC ₅₀ uM	0.1926	0.1025	0.2318	0.1905	5.484	>100	>100

【0 7 3 0】

【表 3 2 B】

表 2 9 B。図 5 2 C の要約

ELISA	ペプチド-A	ペプチド-I	ペプチド-10	ペプチド-K	ペプチド-L	ペプチド-M	ペプチド-N
IC ₅₀ uM	0.1138	>100	63.18	>100	86.78	36.66	3.009

【0 7 3 1】

【表 3 2 C】

表 2 9 C。図 5 2 E の要約

ELISA	ペプチド-O	ペプチド-P	ペプチド-Q	ペプチド-R	ペプチド-S	ペプチド-T
IC ₅₀ uM	0.1473	3.333	>100	>100	>100	41.46

【0 7 3 2】

10

20

30

40

50

【表 3 2 D】

表 2 9 D。図 5 2 F の要約

ELISA	ペプチド-U	ペプチド-V	ペプチド-W	ペプチド-X	ペプチド-Y	ペプチド-Z
IC ₅₀ uM	>100	>100	1.912	0.6992	1.456	0.1180

【 0 7 3 3 】

【表 3 3 - 1】

【表 3 0】

10

表 3 0。CD 3 アラニンスキャン配列ーペプチドー A およびペプチドー B

ペプチド-ID	抗 CD3 パニングされた 標的	配列	配列番号
ペプチド-A	SP34.185	GSQCLGPEWEVCPY	797
ペプチド-C	SP34.185	ASQCLGPEWEVCPY	798
ペプチド-D	SP34.185	GAQCLGPEWEVCPY	799
ペプチド-E	SP34.185	GSACLGPEWEVCPY	800
ペプチド-F	SP34.185	GSQCAGPEWEVCPY	801
ペプチド-G	SP34.185	GSQCLAPEWEVCPY	802
ペプチド-H	SP34.185	GSQCLGAWEVCPY	803
ペプチド-I	SP34.185	GSQCLGPAWEVCPY	804
ペプチド-J	SP34.185	GSQCLGPEAEVCPY	805
ペプチド-K	SP34.185	GSQCLGPEWAVCPY	806
ペプチド-L	SP34.185	GSQCLGPEWEACPY	807
ペプチド-M	SP34.185	GSQCLGPEWEVCAY	808
ペプチド-N	SP34.185	GSQCLGPEWEVCPA	809
ペプチド-A	SP34.185	GSQCLGPEWEVCPY	810
ペプチド-B	SP34.185	VYCGPEFDES VGCM	811
ペプチド-O	SP34.185	AYCGPEFDES VGCM	812
ペプチド-P	SP34.185	VACGPEFDES VGCM	813

20

30

40

【 0 7 3 4 】

50

【表 3 3 - 2】

ペプチド-Q	SP34.185	VYCAPEFDESVGCM	814
ペプチド-R	SP34.185	VYCGAEFDESVGCM	815
ペプチド-S	SP34.185	VYCGPAFDESVGCM	816
ペプチド-T	SP34.185	VYCGPEADESVGCM	817
ペプチド-U	SP34.185	VYCGPEFAESVGCM	818
ペプチド-V	SP34.185	VYCGPEFDASVGCM	819
ペプチド-W	SP34.185	VYCGPEFDEAVGCM	820
ペプチド-X	SP34.185	VYCGPEFDESAGCM	821
ペプチド-Y	SP34.185	VYCGPEFDESACM	822
ペプチド-Z	SP34.185	VYCGPEFDESVGCA	823

【0735】

実施例 23：最適化されたファージライブラリー構造のパニングーCD3 scFv ペプチド

ファージ最適化ライブラリーが完成すると、SP34.185 scFv 負荷ビーズを用いてファージライブラリーをバイオパニングした。複数回のパニングを行い、その中でバクテリオファージを SP34.185 scFv 負荷ビーズに結合させ、洗浄し、溶出させ、増幅させた。固定濃度の CD3、ペプチド A、またはペプチド B を使用する各回のパニング中に、さらなる選択圧を含めた。パニング後、ファージ感染細菌を播種し、コロニーを 96 ウェルブロックに採取した。次いで、クローンファージを増幅し、遠心分離によって細菌細胞から分離した。飽和濃度の CD3 の存在下または非存在下で、ファージ含有上清を SP34.185 scFv コーティングプレートに対する結合 ELISA で試験した。結合シグナルが CD3 の存在下で減少した場合、SP34.185 scFv に結合することができるファージを配列分析のために選択した。

【0736】

実施例 24：ELISA のパニングーCD3 scFv ペプチド

クローンファージを粗上清として回収し、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によってスクリーニングした。簡潔に言えば、ビオチン化 SP34.185 scFv をニュートラアビジンコーティングプレート上に捕捉した。クローンファージの添加前に、ウェルをブロッキング緩衝液および CD3 で、またはブロッキング緩衝液単独でインキュベートした。次いで、洗浄または吸引することなく、クローンファージ上清をウェルに添加し、短時間インキュベートした。次いで、ウェルを洗浄し、その後、西洋ワサビ

ペルオキシダーゼコンジュゲート抗M13抗体を用いて結合ファージを検出した。その後、関心対象のクローンファージを配列分析に送った。

【0737】

CD3 scFvペプチド-Bライブラリー配列のファージパニング結果を表31に示す。合成のために選択されたペプチドの配列を表32に示し、抗CD3 scFvへの結合(図53A~53B)およびCD3への抗CD3 scFv結合の阻害(図54A~54B)についてさらに評価する。図55に示されるコンセンサス配列は、表31に示される全ての配列から算出され、WebLogo 3.7.4を使用して生成された。

【0738】

【表34-1】

10

【表31】

表31。ペプチド-B最適化ライブラリーパニングからのクローンファージペプチド配列、(ー)はCD3scFvペプチド-Bの対応する位置(例えば、ファージ-1の位置)における同じアミノ酸を指す。

ファージ ID	アミノ酸位置配列														ファージ結合 ELISA			配列番号
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	バックグラウンドシグナル	CD3 の存在下における scFv シグナル	CD3 の存在下における SP34.185 scFv シグナル	
ファージ-B	V	Y	C	G	P	E	F	D	E	S	V	G	C	M	0.06	2.79	0.09	25
ファージ-B1	D	D	-	W	-	D	W	E	F	D	F	A	-	A	0.08	2.75	0.09	824
ファージ-B2	Y	I	-	-	L	D	-	P	D	F	L	Y	-	D	0.08	2.88	0.10	825
ファージ-B3	F	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	F	V	-	D	0.08	2.79	0.09	826
ファージ-B4	Y	I	-	W	-	D	W	E	-	Y	F	D	-	D	0.08	2.74	0.09	827
ファージ-B5	N	I	-	W	-	D	W	E	D	D	Y	F	-	F	0.09	2.54	0.09	828
ファージ-B6	N	F	-	W	-	D	W	E	Y	I	Y	P	-	I	0.07	2.77	0.09	829
ファージ-B7	-	D	-	W	-	D	W	E	-	D	F	L	-	I	0.08	2.54	0.08	830
ファージ-B8	H	A	-	W	-	D	W	E	-	Y	F	P	-	N	0.08	2.85	0.09	831
ファージ-B9	Y	D	-	-	-	D	V	-	-	-	Y	V	-	V	0.09	2.63	0.10	832
ファージ-B10	I	D	-	W	-	D	W	E	D	D	T	F	-	Y	0.09	2.73	0.08	833
ファージ-B11	Y	L	-	-	-	D	G	-	-	T	L	A	-	Y	0.08	2.66	0.15	834
ファージ-B12	-	D	-	-	-	D	G	-	-	-	I	L	-	Y	0.11	2.13	0.08	835
ファージ-B13	F	I	-	W	-	D	W	E	-	D	Y	F	-	A	0.07	2.44	0.09	843
ファージ-B14	G	D	-	W	-	D	W	E	W	D	F	Y	-	D	0.07	2.71	0.07	844
ファージ-B15	Y	L	-	W	-	D	W	E	Y	I	D	L	-	D	0.12	2.67	0.08	845
ファージ-B16	S	F	-	W	-	D	W	E	-	Y	F	D	-	D	0.10	2.60	0.07	846
ファージ-B17	D	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	A	S	-	D	0.09	2.57	0.07	847
ファージ-B18	N	L	-	W	-	D	W	E	Y	P	F	F	-	D	0.09	2.52	0.09	848
ファージ-B19	F	D	-	W	-	D	W	E	-	-	F	V	-	D	0.08	2.34	0.09	849
ファージ-B20	D	I	-	-	-	D	G	-	-	T	I	I	-	D	0.13	2.30	0.10	850
ファージ-B21	D	D	-	W	-	D	W	E	Y	Y	A	V	-	D	0.09	2.28	0.09	851
ファージ-B22	Y	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	S	N	-	D	0.10	2.17	0.08	852
ファージ-B23	I	N	-	W	-	D	W	E	D	Y	F	F	-	D	0.07	2.16	0.07	853
ファージ-B24	N	I	-	W	-	D	W	E	D	D	T	F	-	F	0.06	2.87	0.07	854
ファージ-B25	N	I	-	W	-	D	W	E	P	N	S	F	-	F	0.09	2.87	0.08	855
ファージ-B26	Y	D	-	-	-	-	M	-	-	-	I	D	-	F	0.09	2.39	0.08	856
ファージ-B27	D	F	-	W	-	D	W	E	F	P	F	I	-	H	0.11	2.73	0.12	857
ファージ-B28	D	F	-	-	-	-	M	-	-	-	I	T	-	I	0.07	2.36	0.08	858
ファージ-B29	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	-	T	V	-	I	0.10	2.32	0.08	859
ファージ-B30	H	D	-	W	-	D	W	E	W	D	I	F	-	I	0.07	2.26	0.08	860

20

30

40

50

【 0 7 3 9 】
【 表 3 4 - 2 】

ブローシ32	H	A	-	W	-	D	W	E	-	Y	N	P	-	N	0.11	2.71	0.11	861
ブローシ33	D	V	-	W	-	D	W	E	W	D	F	F	-	N	0.08	2.65	0.08	862
ブローシ34	N	-	-	W	-	D	W	E	Y	Y	I	P	-	N	0.10	2.57	0.08	863
ブローシ35	I	I	-	W	-	D	W	E	F	I	D	Y	-	N	0.08	2.10	0.07	864
ブローシ36	S	L	-	W	-	D	W	E	Y	D	I	A	-	P	0.07	2.53	0.08	865
ブローシ37	D	L	-	-	-	-	L	-	-	-	I	F	-	P	0.08	2.49	0.09	866
ブローシ38	T	N	-	W	-	D	W	E	W	V	L	P	-	P	0.14	2.47	0.10	867
ブローシ39	I	E	-	W	-	D	W	E	P	N	Y	F	-	P	0.13	2.29	0.09	868
ブローシ40	I	F	-	W	-	D	W	E	D	Y	-	D	-	P	0.07	2.28	0.07	869
ブローシ41	I	D	-	W	-	D	W	E	Y	D	F	F	-	P	0.07	2.26	0.08	870
ブローシ42	L	F	-	W	-	D	W	E	D	-	F	F	-	P	0.18	2.11	0.13	871
ブローシ43	-	D	-	W	-	D	W	E	D	Y	A	D	-	T	0.11	2.20	0.10	872
ブローシ44	-	I	-	W	-	D	W	E	Q	Y	F	P	-	V	0.11	2.34	0.09	873
ブローシ45	I	E	-	W	-	D	W	E	P	I	Y	P	-	Y	0.09	2.85	0.09	874
ブローシ46	I	T	-	W	-	D	W	E	V	Y	F	P	-	Y	0.07	2.55	0.08	875
ブローシ47	I	D	-	W	-	D	W	E	Y	I	H	P	-	Y	0.06	2.51	0.09	876
ブローシ48	I	D	-	W	-	D	W	E	Y	I	N	P	-	Y	0.12	2.50	0.12	877
ブローシ49	A	D	-	W	-	D	W	E	-	A	F	P	-	Y	0.09	2.44	0.09	878
ブローシ50	I	D	-	W	-	D	W	E	Y	I	Y	P	-	Y	0.09	2.31	0.07	879
ブローシ51	N	I	-	W	-	D	W	E	D	D	N	F	-	F	0.09	2.08	0.09	880
ブローシ52	Y	D	-	W	-	D	W	E	Y	V	D	A	-	Y	0.09	2.06	0.09	881
ブローシ53	F	-	-	-	-	D	G	-	-	-	Y	V	-	D	0.09	2.03	0.11	882
ブローシ54	D	I	-	W	-	D	W	E	Y	I	N	I	-	S	0.11	2.02	0.11	883
ブローシ55	F	V	-	W	-	D	W	E	D	F	N	F	-	D	0.07	2.01	0.08	884
ブローシ56	F	A	-	W	-	D	W	E	D	Y	-	A	-	D	0.07	2.01	0.09	885
ブローシ57	D	N	-	W	-	D	W	E	Y	D	F	F	-	V	0.08	1.99	0.09	886
ブローシ58	Y	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	N	D	-	A	0.09	1.96	0.11	887
ブローシ59	D	D	-	-	-	D	G	-	-	T	I	I	-	V	0.07	1.91	0.09	888
ブローシ60	F	P	-	W	-	D	W	E	-	Y	A	I	-	D	0.10	1.89	0.10	889
ブローシ61	P	D	-	-	-	D	G	-	-	-	L	F	-	T	0.12	1.86	0.07	890
ブローシ62	D	N	-	W	-	D	W	E	Y	D	Y	F	-	V	0.07	1.83	0.07	891
ブローシ63	I	F	-	W	-	D	W	E	-	F	Y	D	-	Y	0.12	1.82	0.08	892
ブローシ64	A	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	F	P	-	N	0.08	1.82	0.08	893
ブローシ65	H	T	-	W	-	D	W	E	D	D	I	F	-	N	0.12	1.81	0.10	894
ブローシ66	F	A	-	W	-	D	W	E	-	A	F	L	-	L	0.09	1.80	0.09	895
ブローシ67	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	A	-	D	0.08	1.77	0.08	896
ブローシ68	N	S	-	W	-	D	W	E	Y	D	I	I	-	D	0.08	1.77	0.10	897
ブローシ69	F	A	-	W	-	D	W	E	-	V	A	P	-	Y	0.07	1.75	0.07	898
ブローシ70	L	D	-	-	-	D	G	-	-	T	L	T	-	Y	0.10	1.75	0.12	899
ブローシ71	-	L	-	W	-	D	W	E	-	F	Y	D	-	P	0.07	1.74	0.09	900
ブローシ72	H	A	-	W	-	V	W	E	-	Y	F	P	-	N	0.07	1.72	0.08	901

【 0 7 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 3】

ブローシ-73	N	E	-	W	-	N	G	E	P	T	F	P	-	T	0.08	1.71	0.07	902
ブローシ-74	L	T	-	-	-	D	G	-	-	T	L	Y	-	D	0.08	1.70	0.07	903
ブローシ-75	Y	D	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	P	-	I	0.13	1.67	0.09	904
ブローシ-76	I	E	-	W	-	D	W	E	P	N	S	F	-	D	0.09	1.66	0.08	905
ブローシ-77	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	H	-	Y	0.12	1.66	0.09	906
ブローシ-78	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	I	-	N	0.08	1.63	0.08	907
ブローシ-79	I	-	-	-	-	-	V	E	-	A	Y	L	-	Y	0.09	1.62	0.10	908
ブローシ-80	F	D	-	-	-	D	G	-	-	T	-	Y	-	D	0.09	1.61	0.08	909
ブローシ-81	I	D	-	-	-	D	G	-	-	T	I	S	-	Y	0.08	1.57	0.11	910
ブローシ-82	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	T	-	L	0.10	1.55	0.11	911
ブローシ-83	Y	D	-	-	-	D	G	-	-	-	Y	F	-	D	0.08	1.53	0.08	912
ブローシ-84	N	F	-	W	-	D	W	E	Y	F	N	D	-	N	0.09	1.53	0.09	913
ブローシ-85	-	L	-	W	-	D	W	E	A	F	F	D	-	D	0.07	1.47	0.07	914
ブローシ-86	I	-	-	-	-	-	W	E	W	P	-	A	-	N	0.16	1.47	0.10	915
ブローシ-87	-	F	-	W	-	D	W	E	D	N	F	F	-	N	0.08	1.46	0.10	916
ブローシ-88	-	V	-	W	-	D	W	E	T	F	F	P	-	D	0.08	1.46	0.08	917
ブローシ-89	D	N	-	-	-	D	G	-	-	T	Y	I	-	N	0.10	1.45	0.09	918
ブローシ-90	D	N	-	W	-	D	W	E	Y	N	F	F	-	V	0.07	1.45	0.08	919
ブローシ-91	F	-	-	-	-	-	V	E	-	D	Y	L	-	I	0.10	1.43	0.10	920
ブローシ-92	D	N	-	W	-	D	W	E	Y	D	I	F	-	V	0.07	1.43	0.07	921
ブローシ-93	I	D	-	-	-	-	-	-	-	-	I	A	-	P	0.08	1.42	0.08	922
ブローシ-94	Y	F	-	-	-	-	V	E	-	Y	T	L	-	F	0.10	1.42	0.10	923
ブローシ-95	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	P	-	N	0.06	1.37	0.08	924
ブローシ-96	F	D	-	-	-	-	V	E	-	Y	F	Y	-	A	0.11	1.36	0.08	925
ブローシ-97	D	F	-	W	-	D	W	E	D	F	F	F	-	A	0.18	1.35	0.12	926
ブローシ-98	F	F	-	-	-	D	G	-	-	T	L	S	-	N	0.08	1.35	0.09	927
ブローシ-99	F	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	L	0.14	1.35	0.09	928
ブローシ-100	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	A	I	-	-	Y	0.09	1.32	0.10	929
ブローシ-101	Y	I	-	W	-	D	W	E	-	Y	L	Y	-	P	0.10	1.32	0.15	930
ブローシ-102	F	D	-	W	-	D	W	E	-	P	T	T	-	H	0.08	1.31	0.08	931
ブローシ-103	Y	D	-	W	-	D	W	E	D	F	P	I	-	D	0.14	1.31	0.10	932
ブローシ-104	-	V	-	W	-	D	W	E	Y	I	D	D	-	S	0.08	1.30	0.07	933
ブローシ-105	I	N	-	W	-	D	W	E	V	I	S	F	-	D	0.12	1.30	0.08	934
ブローシ-106	L	S	-	W	-	D	W	E	-	V	T	P	-	L	0.10	1.29	0.10	935
ブローシ-107	F	A	-	W	-	D	W	E	-	V	D	I	-	Y	0.09	1.28	0.08	936
ブローシ-108	Y	D	-	-	-	-	M	-	-	-	I	V	-	D	0.10	1.25	0.08	937
ブローシ-109	Y	D	-	W	-	D	W	E	V	F	I	V	-	D	0.06	1.25	0.07	938
ブローシ-110	D	N	-	W	-	D	W	E	H	N	F	F	-	V	0.10	1.25	0.08	939
ブローシ-111	Y	D	-	-	-	D	G	-	-	-	I	Y	-	P	0.07	1.23	0.08	940
ブローシ-112	Y	D	-	-	-	-	-	E	F	P	Y	Y	-	F	0.12	1.23	0.12	941
ブローシ-113	A	D	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	P	-	V	0.11	1.22	0.09	942

【 0 7 4 1】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 4】

ブローシ-114	F	L	-	-	-	-	V	E	-	V	H	Y	-	S	0.08	1.22	0.10	943
ブローシ-115	T	D	-	W	-	D	W	E	Y	I	T	S	-	S	0.08	1.22	0.08	944
ブローシ-116	A	F	-	-	-	-	L	-	-	-	I	T	-	D	0.09	1.21	0.09	945
ブローシ-117	N	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	F	S	-	Y	0.09	1.19	0.09	946
ブローシ-118	F	D	-	-	-	-	W	E	I	V	T	D	-	Y	0.08	1.19	0.09	947
ブローシ-119	N	L	-	-	-	-	M	-	-	-	I	I	-	P	0.13	1.19	0.11	948
ブローシ-120	D	L	-	-	-	-	M	-	-	-	I	Y	-	D	0.10	1.19	0.14	949
ブローシ-121	F	D	-	-	-	D	G	V	-	D	Y	I	-	D	0.09	1.18	0.09	950
ブローシ-122	Y	A	-	W	-	D	W	E	-	D	F	A	-	Y	0.11	1.18	0.08	951
ブローシ-123	H	D	-	-	-	-	M	-	-	-	I	V	-	V	0.10	1.17	0.10	952
ブローシ-124	-	F	-	-	-	-	-	E	F	I	F	L	-	A	0.07	1.17	0.08	953
ブローシ-125	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	L	-	D	0.08	1.16	0.09	954
ブローシ-126	S	V	-	W	-	D	W	E	-	F	Y	S	-	D	0.11	1.16	0.10	955
ブローシ-127	P	-	-	-	-	D	G	-	-	T	A	I	-	T	0.13	1.16	0.10	956
ブローシ-128	D	D	-	-	-	-	L	E	W	Y	Y	P	-	Y	0.09	1.16	0.08	957
ブローシ-129	F	I	-	-	-	-	-	-	-	-	L	P	-	N	0.08	1.14	0.09	958
ブローシ-130	I	D	-	-	-	-	-	-	-	-	L	P	-	D	0.11	1.14	0.33	959
ブローシ-131	F	L	-	-	-	-	-	E	-	D	A	P	-	Y	0.08	1.13	0.08	960
ブローシ-132	I	F	-	-	-	D	G	-	-	T	H	I	-	H	0.10	1.13	0.07	961
ブローシ-133	-	F	-	W	-	D	W	E	Y	I	D	F	-	N	0.10	1.11	0.21	962
ブローシ-134	I	F	-	-	-	-	Y	-	-	-	L	H	-	I	0.12	1.11	0.11	963
ブローシ-135	H	L	-	W	-	D	W	E	W	Y	-	D	-	P	0.08	1.11	0.10	964
ブローシ-136	F	I	-	-	-	-	M	-	-	-	I	A	-	N	0.08	1.11	0.09	965
ブローシ-137	I	F	-	-	-	-	V	E	M	I	F	L	-	N	0.09	1.10	0.08	966
ブローシ-138	Y	D	-	-	-	-	W	E	F	P	-	D	-	I	0.11	1.09	0.11	967
ブローシ-139	N	L	-	-	-	-	L	-	-	-	I	T	-	F	0.10	1.09	0.08	968
ブローシ-140	F	-	-	-	-	-	V	E	D	F	Y	F	-	Y	0.08	1.09	0.08	969
ブローシ-141	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	I	-	N	0.11	1.07	0.11	970
ブローシ-142	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	P	-	D	0.08	1.07	0.08	971
ブローシ-143	A	I	-	-	-	-	L	-	-	-	I	A	-	P	0.09	1.07	0.09	972
ブローシ-144	-	I	-	-	-	-	V	E	D	Y	N	L	-	Y	0.08	1.07	0.09	973
ブローシ-145	H	T	-	W	-	D	W	E	D	Y	T	V	-	P	0.10	1.06	0.09	974
ブローシ-146	S	D	-	W	-	D	W	E	Y	F	Y	D	-	N	0.10	1.06	0.08	975
ブローシ-147	-	F	-	-	-	D	G	-	-	T	-	H	-	D	0.09	1.05	0.08	976
ブローシ-148	D	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	H	-	I	0.09	1.05	0.08	977
ブローシ-149	A	D	-	-	-	D	G	-	-	-	I	I	-	H	0.07	1.05	0.08	978
ブローシ-150	F	-	-	-	-	-	L	-	-	-	L	T	-	V	0.10	1.05	0.08	979
ブローシ-151	I	L	-	-	-	-	V	E	-	D	Y	Y	-	Y	0.11	1.04	0.09	980
ブローシ-152	H	L	-	W	-	D	W	E	-	Y	H	S	-	D	0.09	1.04	0.09	981
ブローシ-153	I	F	-	W	-	D	W	E	D	Y	N	F	-	T	0.08	1.04	0.11	982
ブローシ-154	I	V	-	-	-	D	G	-	-	T	L	I	-	H	0.12	1.04	0.11	983

【 0 7 4 2】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 5】

ブローシ-130	A	D	-	W	-	D	W	E	W	D	Y	T	-	D	0.12	1.03	0.11	984
ブローシ-136	I	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	-	N	0.20	1.02	0.21	985
ブローシ-137	Y	H	-	W	-	D	W	E	-	Y	T	S	-	D	0.20	1.02	0.09	986
ブローシ-138	N	-	-	-	-	-	V	E	-	Y	A	L	-	T	0.11	1.01	0.10	987
ブローシ-139	F	I	-	-	-	-	M	-	-	-	I	H	-	D	0.15	1.00	0.19	988
ブローシ-140	D	N	-	W	-	D	W	E	-	F	A	V	-	P	0.14	1.00	0.10	989
ブローシ-141	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	T	-	V	-	D	0.10	1.00	0.09	990
ブローシ-142	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	-	I	A	-	Y	0.08	0.99	0.08	991
ブローシ-143	I	D	-	W	-	D	W	E	Y	T	-	H	-	D	0.07	0.97	0.09	992
ブローシ-144	D	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	I	-	I	0.09	0.96	0.09	993
ブローシ-145	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	S	F	-	F	0.09	0.91	0.08	994
ブローシ-146	F	N	-	W	-	D	W	E	D	P	Y	F	-	V	0.09	0.86	0.07	995
ブローシ-147	Y	D	-	-	-	-	Y	-	-	-	S	Y	-	S	0.08	0.82	0.07	996
ブローシ-148	-	A	-	W	-	D	W	E	Y	T	D	S	-	F	0.13	0.79	0.09	997
ブローシ-149	T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	Y	0.10	0.77	0.09	998
ブローシ-150	T	D	-	W	-	D	W	E	F	Y	A	D	-	D	0.07	0.75	0.08	999
ブローシ-151	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	-	I	-	H	0.09	0.69	0.09	1000
ブローシ-152	S	D	-	-	-	D	G	-	-	-	I	I	-	T	0.07	0.69	0.07	1001
ブローシ-153	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	D	-	D	0.08	0.67	0.09	1002
ブローシ-154	F	F	-	-	-	-	I	-	-	-	I	A	-	V	0.08	0.62	0.09	1003
ブローシ-155	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	F	-	D	0.16	0.60	0.10	1004
ブローシ-156	Y	D	-	-	-	-	W	E	W	P	I	D	-	V	0.10	0.59	0.10	1005
ブローシ-157	F	-	-	-	-	-	I	E	L	F	S	F	-	Y	0.13	0.59	0.11	1006
ブローシ-158	Y	-	-	-	-	-	V	-	-	-	I	T	-	P	0.15	0.42	0.11	1007
ブローシ-159	I	L	-	-	-	-	-	-	-	-	I	N	-	N	0.09	0.37	0.25	1008
ブローシ-160	-	V	-	-	-	A	M	G	Q	H	Y	L	-	D	0.08	0.09	0.08	1009
ブローシ-161	-	V	-	-	T	K	M	G	-	H	Y	L	-	S	0.08	0.08	0.08	1010
ブローシ-162	Y	D	-	W	-	D	W	E	Y	V	Y	A	-	Y	0.08	0.98	0.08	1011
ブローシ-163	D	L	-	-	-	-	L	-	-	-	-	N	-	D	0.09	0.98	0.08	1012
ブローシ-164	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	V	-	Y	0.14	0.97	0.16	1013
ブローシ-165	L	D	-	W	-	D	W	E	W	P	Y	S	-	N	0.08	0.96	0.09	1014
ブローシ-166	F	I	-	W	-	D	W	E	D	D	F	F	-	Y	0.08	0.96	0.09	1015
ブローシ-167	D	L	-	-	-	-	V	E	W	Y	F	F	-	N	0.11	0.95	0.10	1016
ブローシ-168	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	V	-	F	0.07	0.94	0.08	1017
ブローシ-169	L	N	-	W	-	V	W	E	D	D	-	F	-	Y	0.09	0.92	0.09	1018
ブローシ-170	F	N	-	W	-	D	W	E	D	P	N	F	-	V	0.09	0.91	0.09	1019
ブローシ-171	-	I	-	W	-	D	W	E	D	D	Y	F	-	P	0.10	0.91	0.13	1020
ブローシ-172	F	L	-	-	-	-	-	-	-	-	S	V	-	Y	0.10	0.91	0.08	1021
ブローシ-173	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	F	-	Y	0.10	0.91	0.09	1022
ブローシ-174	H	L	-	-	-	D	G	-	-	-	F	T	-	F	0.11	0.90	0.10	1023
ブローシ-175	Y	F	-	-	-	-	M	-	-	-	L	Y	-	I	0.08	0.90	0.08	1024

【 0 7 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 6】

ブローシ-190	Y	-	-	-	-	-	V	E	-	Y	A	N	-	Y	0.07	0.90	0.07	1025
ブローシ-191	N	T	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	-	Y	0.16	0.90	0.58	1026
ブローシ-198	I	D	-	W	-	D	W	E	-	A	F	N	-	Y	0.09	0.90	0.08	1027
ブローシ-199	A	-	-	-	-	-	L	E	-	F	F	L	-	T	0.09	0.89	0.08	1028
ブローシ-200	I	-	-	-	-	-	V	E	-	V	H	H	-	Y	0.08	0.89	0.08	1029
ブローシ-201	F	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	D	0.10	0.89	0.11	1030
ブローシ-202	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	T	I	I	-	A	0.08	0.89	0.08	1031
ブローシ-203	I	L	-	-	-	-	W	E	Y	P	L	D	-	S	0.09	0.89	0.10	1032
ブローシ-204	F	I	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	-	N	0.09	0.88	0.10	1033
ブローシ-205	F	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	S	-	D	0.17	0.88	0.15	1034
ブローシ-206	H	L	-	-	-	-	L	-	-	-	-	T	-	F	0.10	0.87	0.10	1035
ブローシ-207	L	I	-	-	-	-	V	E	D	Y	S	L	-	H	0.09	0.87	0.09	1036
ブローシ-208	Y	F	-	-	-	-	M	-	-	-	-	Y	-	D	0.08	0.87	0.08	1037
ブローシ-209	H	-	-	-	-	-	M	-	-	-	I	Y	-	I	0.13	0.87	0.09	1038
ブローシ-210	F	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	N	-	D	0.08	0.87	0.09	1039
ブローシ-211	Y	-	-	-	-	-	V	E	-	Y	I	Y	-	T	0.07	0.87	0.08	1040
ブローシ-212	L	A	-	W	-	V	R	E	-	I	N	A	-	I	0.08	0.85	0.07	1041
ブローシ-213	I	D	-	W	-	D	W	E	D	I	T	F	-	D	0.08	0.85	0.08	1042
ブローシ-214	I	V	-	-	-	-	L	-	-	-	I	T	-	P	0.11	0.85	0.15	1043
ブローシ-215	F	-	-	-	-	-	-	E	L	P	A	D	-	D	0.08	0.85	0.09	1044
ブローシ-216	F	D	-	-	-	-	-	-	-	-	N	P	-	F	0.10	0.85	0.09	1045
ブローシ-217	D	A	-	W	-	D	W	E	-	Y	S	S	-	D	0.10	0.83	0.10	1046
ブローシ-218	D	H	-	W	-	D	W	E	P	N	Y	F	-	V	0.08	0.83	0.09	1047
ブローシ-219	D	-	-	W	-	D	W	E	I	N	Y	I	-	F	0.09	0.83	0.10	1048
ブローシ-220	I	-	-	W	-	D	W	E	Y	V	Y	A	-	N	0.10	0.82	0.09	1049
ブローシ-221	D	F	-	-	-	-	V	E	-	D	Y	L	-	D	0.07	0.82	0.08	1050
ブローシ-222	H	D	-	-	-	D	G	R	-	D	Y	D	-	A	0.11	0.82	0.09	1051
ブローシ-223	L	A	-	W	-	D	W	E	D	D	Y	F	-	V	0.08	0.82	0.09	1052
ブローシ-224	D	I	-	W	-	D	W	E	D	Y	L	P	-	V	0.10	0.82	0.10	1053
ブローシ-225	I	E	-	-	-	-	I	E	V	Y	A	L	-	P	0.08	0.81	0.10	1054
ブローシ-226	I	F	-	-	-	-	W	E	F	-	-	L	-	N	0.10	0.81	0.11	1055
ブローシ-227	T	-	-	-	-	-	V	E	D	F	S	L	-	V	0.07	0.80	0.08	1056
ブローシ-228	F	I	-	-	-	-	W	E	F	V	D	A	-	F	0.11	0.80	0.09	1057
ブローシ-229	F	A	-	W	-	D	W	E	-	D	S	P	-	D	0.06	0.80	0.07	1058
ブローシ-230	I	L	-	-	-	-	V	E	-	L	I	F	-	P	0.12	0.80	0.08	1059
ブローシ-231	F	-	-	-	-	-	V	E	-	Y	I	Y	-	Y	0.08	0.80	0.08	1060
ブローシ-232	D	S	-	-	-	-	L	-	-	-	I	I	-	D	0.10	0.79	0.09	1061
ブローシ-233	F	L	-	-	-	D	G	-	-	T	S	V	-	D	0.11	0.79	0.08	1062
ブローシ-234	F	N	-	W	-	N	G	E	P	T	Y	F	-	V	0.11	0.79	0.08	1063
ブローシ-235	L	A	-	W	-	V	W	E	Y	P	-	T	-	I	0.09	0.78	0.09	1064
ブローシ-236	D	-	-	-	-	-	V	E	-	D	-	Y	-	Y	0.09	0.78	0.09	1065

【0 7 4 4】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 7】

ブローシ-237	I	T	-	W	-	D	W	E	-	Y	A	N	-	T	0.08	0.77	0.07	1066
ブローシ-238	F	F	-	-	-	D	G	-	-	T	Y	S	-	I	0.15	0.77	0.13	1067
ブローシ-239	T	D	-	W	-	D	W	E	Y	A	T	S	-	D	0.09	0.76	0.09	1068
ブローシ-240	F	N	-	-	-	D	G	Y	-	D	Y	L	-	D	0.10	0.76	0.11	1069
ブローシ-241	Y	D	-	W	-	D	W	E	V	D	F	H	-	P	0.11	0.76	0.08	1070
ブローシ-242	N	I	-	W	-	D	W	E	D	D	S	F	-	F	0.08	0.76	0.08	1071
ブローシ-243	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	S	0.13	0.75	0.09	1072
ブローシ-244	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	F	-	D	0.10	0.74	0.09	1073
ブローシ-245	P	I	-	-	-	-	Y	-	-	-	D	V	-	A	0.08	0.74	0.08	1074
ブローシ-246	Y	-	-	-	-	D	G	-	-	Y	N	S	-	I	0.11	0.74	0.11	1075
ブローシ-247	-	D	-	W	-	D	W	E	V	F	I	A	-	D	0.11	0.74	0.10	1076
ブローシ-248	D	L	-	-	-	-	V	E	-	V	N	L	-	L	0.12	0.74	0.10	1077
ブローシ-249	F	D	-	-	-	-	M	-	-	-	T	T	-	F	0.09	0.74	0.09	1078
ブローシ-250	N	F	-	W	-	D	W	E	P	I	Y	F	-	T	0.13	0.74	0.14	1079
ブローシ-251	-	D	-	-	-	D	G	-	-	-	F	F	-	L	0.08	0.73	0.08	1080
ブローシ-252	-	D	-	-	-	D	G	-	-	T	A	F	-	I	0.10	0.73	0.09	1081
ブローシ-253	N	I	-	-	-	-	M	-	-	-	L	V	-	I	0.10	0.73	0.09	1082
ブローシ-254	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-	F	F	-	F	0.08	0.73	0.09	1083
ブローシ-255	N	F	-	-	-	-	Y	-	-	-	I	S	-	I	0.10	0.73	0.38	1084
ブローシ-256	H	L	-	-	-	-	I	E	-	A	D	I	-	N	0.11	0.73	0.51	1085
ブローシ-257	D	-	-	-	-	-	V	E	-	D	Y	L	-	D	0.08	0.72	0.09	1086
ブローシ-258	D	-	-	-	-	-	L	-	-	-	I	N	-	D	0.11	0.72	0.10	1087
ブローシ-259	F	-	-	-	-	-	L	-	-	-	L	F	-	V	0.09	0.72	0.08	1088
ブローシ-260	P	D	-	-	-	-	W	E	F	Y	-	T	-	N	0.12	0.72	0.08	1089
ブローシ-261	F	D	-	-	-	-	-	E	Y	I	Y	A	-	T	0.09	0.72	0.08	1090
ブローシ-262	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	I	-	N	0.12	0.72	0.11	1091
ブローシ-263	D	F	-	-	-	-	V	E	-	Y	I	F	-	F	0.08	0.72	0.07	1092
ブローシ-264	P	V	-	W	-	D	W	E	Y	V	S	S	-	D	0.08	0.71	0.08	1093
ブローシ-265	Y	I	-	-	-	-	R	-	-	-	N	L	-	L	0.09	0.71	0.09	1094
ブローシ-266	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	V	-	D	0.11	0.71	0.11	1095
ブローシ-267	H	D	-	W	-	D	W	E	D	F	Y	F	-	V	0.09	0.71	0.08	1096
ブローシ-268	H	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	I	D	-	Y	0.12	0.71	0.10	1097
ブローシ-269	L	F	-	-	-	-	M	P	-	D	I	F	-	N	0.08	0.71	0.08	1098
ブローシ-270	H	D	-	-	-	-	L	E	F	H	Y	A	-	Y	0.10	0.71	0.12	1099
ブローシ-271	D	F	-	-	-	-	L	-	-	-	I	N	-	F	0.08	0.70	0.08	1100
ブローシ-272	Y	F	-	-	-	-	L	-	-	-	I	A	-	N	0.10	0.70	0.10	1101
ブローシ-273	T	D	-	W	-	D	W	E	D	D	I	I	-	D	0.10	0.70	0.08	1102
ブローシ-274	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	Y	-	F	0.09	0.70	0.08	1103
ブローシ-275	Y	-	-	W	-	D	W	W	-	Y	-	T	-	D	0.10	0.70	0.11	1104
ブローシ-276	P	I	-	-	-	-	L	E	-	-	Y	L	-	N	0.13	0.69	0.52	1105
ブローシ-277	F	D	-	-	-	-	-	-	-	-	I	V	-	Y	0.12	0.69	0.11	1106

【 0 7 4 5 】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 8】

ブローシ-218	-	L	-	-	-	D	G	I	-	F	F	D	-	P	0.09	0.68	0.07	1107
ブローシ-219	A	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	L	T	-	V	0.07	0.68	0.07	1108
ブローシ-280	D	F	-	-	-	-	L	-	-	-	I	I	-	A	0.14	0.68	0.14	1109
ブローシ-281	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	-	L	D	-	N	0.08	0.68	0.08	1110
ブローシ-282	A	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	D	0.14	0.67	0.08	1111
ブローシ-283	L	L	-	-	-	D	G	V	-	D	F	F	-	D	0.10	0.67	0.10	1112
ブローシ-284	N	F	-	-	-	-	L	P	-	D	I	F	-	F	0.12	0.66	0.13	1113
ブローシ-285	F	-	-	-	-	-	V	E	-	V	S	L	-	N	0.08	0.66	0.08	1114
ブローシ-286	Y	D	-	-	-	D	G	Y	-	A	F	Y	-	H	0.12	0.66	0.10	1115
ブローシ-287	N	F	-	-	-	-	I	E	F	D	Y	L	-	D	0.08	0.65	0.08	1116
ブローシ-288	D	-	-	-	-	D	G	V	-	D	F	I	-	N	0.06	0.65	0.08	1117
ブローシ-289	T	D	-	W	-	D	W	E	Y	I	Y	S	-	S	0.08	0.65	0.07	1118
ブローシ-290	F	-	-	-	-	-	-	E	-	I	T	N	-	I	0.14	0.65	0.11	1119
ブローシ-291	F	D	-	W	-	D	W	E	-	-	F	F	-	H	0.07	0.64	0.08	1120
ブローシ-292	D	F	-	-	-	D	G	-	-	-	-	F	-	P	0.08	0.63	0.08	1121
ブローシ-293	H	N	-	-	-	-	L	-	-	-	L	V	-	D	0.13	0.63	0.09	1122
ブローシ-294	I	-	-	-	-	D	G	A	-	D	Y	T	-	D	0.07	0.63	0.07	1123
ブローシ-295	F	D	-	-	-	-	-	E	F	P	-	I	-	F	0.08	0.62	0.08	1124
ブローシ-296	Y	N	-	-	-	-	L	-	-	-	-	T	-	D	0.09	0.62	0.08	1125
ブローシ-297	F	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	H	-	A	0.07	0.62	0.08	1126
ブローシ-298	D	I	-	-	-	-	V	E	-	Y	F	L	-	F	0.15	0.61	0.10	1127
ブローシ-299	F	D	-	-	-	-	V	-	-	-	L	T	-	F	0.10	0.61	0.09	1128
ブローシ-300	F	D	-	-	-	-	I	E	-	F	H	L	-	F	0.08	0.61	0.08	1129
ブローシ-301	A	-	-	-	-	-	L	-	-	-	I	I	-	D	0.12	0.61	0.10	1130
ブローシ-302	Y	N	-	-	-	-	L	-	-	-	I	T	-	N	0.09	0.61	0.10	1131
ブローシ-303	F	D	-	W	-	D	W	E	-	P	-	D	-	L	0.08	0.61	0.07	1132
ブローシ-304	D	V	-	-	-	-	L	-	-	-	-	L	-	P	0.08	0.60	0.08	1133
ブローシ-305	N	-	-	-	-	-	L	-	-	-	L	P	-	P	0.09	0.60	0.08	1134
ブローシ-306	Y	-	-	W	-	D	W	E	Y	D	I	F	-	S	0.08	0.60	0.10	1135
ブローシ-307	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	T	Y	-	N	0.08	0.60	0.09	1136
ブローシ-308	F	-	-	-	-	-	-	E	-	V	F	H	-	Y	0.09	0.60	0.09	1137
ブローシ-309	T	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	F	L	-	D	0.07	0.60	0.09	1138
ブローシ-310	-	L	-	-	-	-	W	E	-	-	Y	L	-	P	0.09	0.60	0.09	1139
ブローシ-311	D	D	-	-	-	N	G	Y	A	T	F	I	-	Y	0.06	0.59	0.08	1140
ブローシ-312	F	L	-	-	-	-	I	E	D	D	T	H	-	Y	0.16	0.59	0.38	1141
ブローシ-313	F	A	-	W	-	D	W	E	-	T	I	P	-	H	0.08	0.59	0.08	1142
ブローシ-314	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	N	-	Y	0.10	0.58	0.08	1143
ブローシ-315	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	-	I	S	-	I	0.09	0.58	0.09	1144
ブローシ-316	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	Y	0.12	0.57	0.10	1145
ブローシ-317	A	I	-	W	-	D	W	E	-	F	-	D	-	Y	0.10	0.57	0.09	1146
ブローシ-318	L	T	-	W	-	V	R	E	-	I	F	A	-	D	0.07	0.57	0.08	1147

【 0 7 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 9】

ブローシ2119	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	Y	-	N	0.09	0.57	0.09	1148
ブローシ220	N	V	-	-	-	-	-	-	-	-	A	P	-	N	0.07	0.56	0.08	1149
ブローシ221	H	D	-	-	-	-	-	-	-	-	I	S	-	V	0.11	0.55	0.09	1150
ブローシ222	F	D	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	T	0.12	0.55	0.41	1151
ブローシ223	Y	F	-	-	-	-	-	-	-	-	V	E	-	H	0.09	0.55	0.08	1152
ブローシ224	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.09	0.54	0.09	1153
ブローシ225	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	V	P	-	D	0.11	0.54	0.08	1154
ブローシ226	D	N	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.10	0.54	0.08	1155
ブローシ227	-	H	-	W	-	D	W	E	P	N	Y	V	-	D	0.10	0.54	0.08	1156
ブローシ228	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.09	0.53	0.09	1157
ブローシ229	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.08	0.53	0.11	1158
ブローシ230	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.13	0.53	0.09	1159
ブローシ231	D	F	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	I	N	0.14	0.52	0.48	1160
ブローシ232	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	A	-	Y	0.08	0.52	0.07	1161
ブローシ233	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	N	S	-	Y	0.10	0.52	0.11	1162
ブローシ234	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	-	I	D	-	D	0.09	0.52	0.09	1163
ブローシ235	D	S	-	-	-	-	-	-	-	-	E	F	Y	Y	0.11	0.52	0.14	1164
ブローシ236	Y	I	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.10	0.52	0.08	1165
ブローシ237	F	D	-	-	-	-	-	-	-	-	V	E	-	D	0.11	0.52	0.10	1166
ブローシ238	F	D	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	0.08	0.52	0.07	1167
ブローシ239	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	D	G	-	-	0.10	0.51	0.10	1168
ブローシ240	I	P	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	0.12	0.51	0.09	1169
ブローシ241	I	I	-	-	-	-	-	-	-	-	D	G	Y	-	0.12	0.51	0.09	1170
ブローシ242	I	F	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.11	0.51	0.08	1171
ブローシ243	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	D	-	Y	0.18	0.51	0.18	1172
ブローシ244	L	S	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	0.12	0.51	0.08	1173
ブローシ245	Y	D	-	W	-	D	W	E	Y	N	I	D	-	T	0.08	0.51	0.09	1174
ブローシ246	N	H	-	-	-	-	-	-	-	-	D	G	-	-	0.09	0.51	0.08	1175
ブローシ247	N	F	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.11	0.50	0.12	1176
ブローシ248	F	H	-	-	-	-	-	-	-	-	I	E	-	Y	0.08	0.50	0.09	1177
ブローシ249	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	E	D	Y	0.07	0.50	0.08	1178
ブローシ250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	G	-	-	0.09	0.50	0.08	1179
ブローシ251	L	I	-	-	-	-	-	-	-	-	V	I	A	-	0.17	0.50	0.26	1180
ブローシ252	D	I	-	-	-	-	-	-	-	-	I	P	-	D	0.10	0.50	0.08	1181
ブローシ253	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	E	-	A	0.11	0.50	0.45	1182
ブローシ254	I	D	-	W	-	D	W	E	D	D	S	I	-	Y	0.10	0.50	0.10	1183
ブローシ255	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	V	E	D	F	0.09	0.50	0.11	1184
ブローシ256	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	I	E	-	0.09	0.49	0.09	1185
ブローシ257	F	F	-	-	-	-	-	-	-	-	E	V	H	S	0.14	0.49	0.38	1186
ブローシ258	N	D	-	-	-	-	-	-	-	-	V	E	L	V	0.10	0.49	0.08	1187
ブローシ259	D	L	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	0.09	0.49	0.08	1188

【 0 7 4 7】

【表 3 4 - 1 0】

ワード-J-360	I	P	-	-	-	-	V	E	D	Y	N	L	-	N	0.08	0.49	0.08	1189	
ワード-J-361	Y	-	-	-	-	-	L	E	W	P	-	V	-	N	0.10	0.49	0.10	1190	
ワード-J-362	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	-	N	0.08	0.49	0.10	1191		
ワード-J-363	-	-	-	-	-	D	G	-	-	-	F	D	-	A	0.08	0.49	0.08	1192	
ワード-J-364	N	D	-	-	-	-	W	E	D	T	Y	F	-	L	0.08	0.49	0.10	1193	
ワード-J-365	P	-	-	-	-	-	M	E	-	L	S	N	-	S	0.13	0.48	0.16	1194	
ワード-J-366	D	D	-	-	-	-	-	E	V	I	S	D	-	Y	0.15	0.48	0.10	1195	
ワード-J-367	D	L	-	-	-	-	-	P	-	D	-	P	-	D	0.08	0.48	0.08	1196	
ワード-J-368	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	V	-	Y	0.11	0.48	0.10	1197	
ワード-J-369	A	-	-	-	-	-	Y	E	V	F	A	D	-	N	0.10	0.48	0.11	1198	
ワード-J-370	I	D	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	D	-	L	0.09	0.48	0.09	1199	
ワード-J-371	H	I	-	W	-	D	W	E	-	F	H	D	-	N	0.07	0.48	0.08	1200	
ワード-J-372	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	T	I	T	-	L	0.08	0.48	0.08	1201	
ワード-J-373	Y	L	-	-	-	-	L	-	-	T	I	L	-	N	0.09	0.48	0.08	1202	
ワード-J-374	F	F	-	-	-	-	-	E	-	A	F	L	-	F	0.10	0.48	0.14	1203	
ワード-J-375	I	L	-	-	-	-	L	-	-	-	F	T	-	A	0.07	0.47	0.08	1204	
ワード-J-376	F	H	-	-	-	-	V	E	L	Y	T	D	-	N	0.09	0.47	0.08	1205	
ワード-J-377	N	L	-	-	-	-	V	E	-	Y	N	F	-	Y	0.08	0.47	0.08	1206	
ワード-J-378	F	D	-	-	-	-	V	E	-	T	Y	Y	-	F	0.21	0.47	0.09	1207	
ワード-J-379	-	F	-	-	-	-	-	E	-	D	H	Y	-	Y	0.12	0.47	0.37	1208	
ワード-J-380	A	I	-	-	-	-	W	E	V	V	A	D	-	N	0.11	0.47	0.11	1209	
ワード-J-381	F	I	-	W	-	D	W	E	-	D	N	Y	-	N	0.12	0.47	0.25	1210	
ワード-J-382	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	I	-	D	0.08	0.47	0.10	1211	
ワード-J-383	N	L	-	-	-	-	V	E	D	V	Y	D	-	H	0.12	0.47	0.43	1212	
ワード-J-384	H	-	-	-	-	-	V	E	-	Y	H	N	-	N	0.09	0.47	0.09	1213	
ワード-J-385	D	I	-	-	-	-	Y	-	-	-	Y	S	-	T	0.09	0.47	0.09	1214	
ワード-J-386	D	-	-	-	-	-	L	-	-	T	L	I	-	A	0.13	0.46	0.10	1215	
ワード-J-387	I	A	-	-	-	-	M	P	-	D	I	D	-	Y	0.12	0.46	0.09	1216	
ワード-J-388	I	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	F	-	D	0.10	0.46	0.10	1217	
ワード-J-389	Y	F	-	-	-	-	D	V	E	-	D	F	A	-	D	0.11	0.46	0.11	1218
ワード-J-390	Y	N	-	-	-	-	W	E	Y	A	I	L	-	D	0.12	0.46	0.34	1219	
ワード-J-391	I	-	-	-	-	-	V	E	D	Y	I	V	-	N	0.14	0.46	0.22	1220	
ワード-J-392	Y	D	-	-	-	-	I	-	-	-	T	P	-	A	0.07	0.46	0.07	1221	
ワード-J-393	D	T	-	W	-	D	W	E	H	I	Y	A	-	D	0.09	0.46	0.09	1222	
ワード-J-394	D	I	-	-	-	-	M	-	-	-	-	T	-	N	0.13	0.45	0.12	1223	
ワード-J-395	Y	D	-	W	-	D	W	E	R	Y	F	P	-	I	0.10	0.45	0.09	1224	
ワード-J-396	H	L	-	-	-	-	L	-	-	-	-	A	-	S	0.13	0.45	0.11	1225	
ワード-J-397	Y	D	-	-	-	-	D	G	-	-	T	T	I	-	A	0.09	0.45	0.09	1226
ワード-J-398	Y	-	-	-	-	-	Y	E	D	V	L	D	-	F	0.07	0.45	0.08	1227	
ワード-J-399	D	F	-	-	-	-	M	-	-	T	I	S	-	D	0.14	0.45	0.10	1228	
ワード-J-400	I	L	-	-	-	-	L	-	-	-	L	V	-	D	0.08	0.44	0.07	1229	

【 0 7 4 8】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1 1】

ブローグ-401	L	I	-	-	-	-	W	E	V	I	T	N	-	D	0.12	0.44	0.40	1230
ブローグ-402	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	Y	F	-	-	P	0.09	0.44	0.09	1231
ブローグ-403	A	L	-	-	-	-	V	E	V	Y	D	V	-	V	0.08	0.44	0.08	1232
ブローグ-404	Y	H	-	W	-	D	W	E	D	V	N	F	-	Y	0.10	0.44	0.09	1233
ブローグ-405	F	L	-	-	-	M	G	G	L	T	F	Y	-	Y	0.09	0.44	0.08	1234
ブローグ-406	I	I	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	F	0.09	0.43	0.19	1235
ブローグ-407	F	F	-	-	-	-	M	-	-	-	-	H	-	F	0.11	0.43	0.09	1236
ブローグ-408	A	F	-	-	-	-	-	-	-	-	L	F	-	A	0.09	0.43	0.09	1237
ブローグ-409	N	-	-	-	-	D	G	-	-	T	N	I	-	D	0.08	0.43	0.08	1238
ブローグ-410	Y	L	-	-	-	-	W	E	W	V	H	N	-	L	0.13	0.43	0.09	1239
ブローグ-411	A	T	-	-	-	D	G	-	-	-	H	I	-	A	0.08	0.43	0.09	1240
ブローグ-412	-	-	-	-	-	-	V	E	V	L	D	Y	-	D	0.07	0.42	0.08	1241
ブローグ-413	I	H	-	-	-	-	W	E	F	Y	T	D	-	D	0.08	0.42	0.08	1242
ブローグ-414	D	D	-	-	-	-	L	-	-	T	-	A	-	D	0.13	0.42	0.32	1243
ブローグ-415	Y	L	-	-	-	-	-	-	-	-	I	D	-	N	0.11	0.42	0.17	1244
ブローグ-416	L	L	-	-	-	-	V	E	D	V	F	A	-	Y	0.09	0.42	0.09	1245
ブローグ-417	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	L	T	-	D	0.08	0.42	0.08	1246
ブローグ-418	F	D	-	-	-	-	L	-	-	T	-	N	-	Y	0.09	0.41	0.09	1247
ブローグ-419	F	A	-	W	-	D	W	E	-	I	N	D	-	H	0.08	0.41	0.09	1248
ブローグ-420	Y	-	-	-	-	-	Y	E	-	D	I	Y	-	N	0.09	0.41	0.09	1249
ブローグ-421	N	V	-	-	-	-	V	E	D	Y	T	F	-	Y	0.09	0.40	0.08	1250
ブローグ-422	A	-	-	-	-	-	L	E	-	Y	D	F	-	T	0.12	0.40	0.08	1251
ブローグ-423	F	D	-	-	-	-	I	-	-	-	T	I	-	T	0.08	0.40	0.09	1252
ブローグ-424	N	L	-	-	-	-	L	-	-	T	L	V	-	A	0.10	0.40	0.09	1253
ブローグ-425	Y	S	-	W	-	D	W	E	-	Y	L	A	-	N	0.08	0.40	0.08	1254
ブローグ-426	G	I	-	-	-	-	V	E	D	Y	N	Y	-	D	0.09	0.40	0.10	1255
ブローグ-427	F	F	-	-	-	-	L	-	-	-	-	N	-	H	0.07	0.40	0.07	1256
ブローグ-428	Y	-	-	-	-	-	Y	E	-	D	F	Y	-	F	0.11	0.40	0.09	1257
ブローグ-429	L	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	T	D	-	Y	0.11	0.40	0.10	1258
ブローグ-430	D	-	-	-	-	-	V	E	-	D	F	L	-	Y	0.10	0.40	0.08	1259
ブローグ-431	T	L	-	-	-	-	V	E	L	Y	I	F	-	D	0.08	0.40	0.09	1260
ブローグ-432	F	-	-	-	-	-	-	E	Q	I	A	D	-	Y	0.11	0.40	0.09	1261
ブローグ-433	D	D	-	-	-	-	V	E	-	Y	H	L	-	D	0.11	0.40	0.18	1262
ブローグ-434	D	-	-	-	-	-	L	E	D	V	T	L	-	H	0.13	0.39	0.09	1263
ブローグ-435	-	L	-	-	-	-	V	E	D	V	N	L	-	Y	0.09	0.39	0.08	1264
ブローグ-436	D	I	-	-	-	-	L	-	-	T	I	D	-	Y	0.09	0.39	0.09	1265
ブローグ-437	T	-	-	-	-	-	V	E	-	D	I	N	-	Y	0.08	0.39	0.08	1266
ブローグ-438	I	V	-	W	-	D	W	E	-	Y	P	N	-	D	0.08	0.39	0.08	1267
ブローグ-439	S	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	I	-	T	0.11	0.39	0.10	1268
ブローグ-440	Y	D	-	-	-	-	L	P	-	D	Y	D	-	N	0.15	0.39	0.10	1269
ブローグ-441	N	L	-	W	-	D	W	E	-	Y	Y	A	-	D	0.12	0.39	0.17	1270

【 0 7 4 9 】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1 2】

ブローシ-442	D	D	-	-	-	-	L	-	-	-	L	P	-	H	0.10	0.39	0.08	1271	
ブローシ-443	S	L	-	-	-	D	G	Q	-	D	Y	T	-	F	0.08	0.39	0.08	1272	
ブローシ-444	L	I	-	W	-	D	W	E	-	Y	N	F	-	T	0.13	0.39	0.11	1273	
ブローシ-445	F	H	-	-	-	D	G	-	-	T	-	P	-	I	0.08	0.39	0.08	1274	
ブローシ-446	F	D	-	-	-	-	W	E	W	I	Y	D	-	F	0.08	0.38	0.08	1275	
ブローシ-447	I	-	-	-	-	-	W	-	-	-	L	D	-	D	0.08	0.38	0.09	1276	
ブローシ-448	L	I	-	-	-	-	I	-	-	-	A	S	-	N	0.10	0.38	0.11	1277	
ブローシ-449	T	S	-	W	V	D	W	E	-	F	S	D	-	I	0.11	0.38	0.34	1278	
ブローシ-450	Y	-	-	-	-	-	V	E	-	D	Y	V	-	D	0.10	0.38	0.08	1279	
ブローシ-451	D	D	-	-	-	-	Q	E	F	I	Y	A	-	I	0.09	0.38	0.08	1280	
ブローシ-452	A	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	A	D	-	Y	0.11	0.38	0.10	1281	
ブローシ-453	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	H	-	I	0.08	0.38	0.07	1282	
ブローシ-454	S	E	-	W	-	D	W	E	P	F	F	D	-	N	0.08	0.37	0.09	1283	
ブローシ-455	Y	H	-	-	-	-	M	-	-	-	L	I	-	T	0.07	0.37	0.07	1284	
ブローシ-456	S	D	-	W	-	D	W	E	D	A	Y	F	-	I	0.09	0.37	0.07	1285	
ブローシ-457	-	D	-	-	-	-	V	E	-	Y	Y	H	-	D	0.08	0.37	0.08	1286	
ブローシ-458	D	N	-	-	-	-	Y	-	-	-	I	A	-	N	0.10	0.37	0.10	1287	
ブローシ-459	L	-	-	-	-	V	-	E	F	Y	D	Y	-	Y	0.08	0.37	0.10	1288	
ブローシ-460	Y	T	-	-	-	-	M	-	-	-	-	T	-	I	0.09	0.37	0.08	1289	
ブローシ-461	N	F	-	W	-	D	W	E	V	N	S	F	-	D	0.09	0.37	0.08	1290	
ブローシ-462	N	A	-	W	-	D	W	E	Y	I	D	F	-	N	0.12	0.36	0.09	1291	
ブローシ-463	Y	N	-	-	-	-	M	-	-	-	I	F	-	S	0.09	0.36	0.07	1292	
ブローシ-464	L	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	T	-	Y	0.08	0.36	0.09	1293	
ブローシ-465	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	N	-	D	0.11	0.36	0.08	1294	
ブローシ-466	I	I	-	-	-	-	L	P	-	D	Y	V	-	T	0.08	0.36	0.08	1295	
ブローシ-467	D	I	-	-	-	-	-	-	-	-	I	D	-	S	0.08	0.36	0.08	1296	
ブローシ-468	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	F	0.10	0.36	0.09	1297	
ブローシ-469	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	Y	0.07	0.36	0.08	1298	
ブローシ-470	Y	D	-	W	-	D	W	E	-	A	L	P	-	A	0.08	0.36	0.08	1299	
ブローシ-471	D	D	-	W	-	D	W	E	D	Y	-	F	-	F	0.10	0.36	0.10	1300	
ブローシ-472	H	F	-	-	-	-	W	E	L	F	S	D	-	Y	0.11	0.36	0.11	1301	
ブローシ-473	I	T	-	W	-	D	W	E	V	N	F	P	-	Y	0.07	0.35	0.07	1302	
ブローシ-474	P	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	T	-	N	0.20	0.35	0.16	1303	
ブローシ-475	N	L	-	W	-	D	W	E	A	F	F	P	-	Y	0.08	0.35	0.07	1304	
ブローシ-476	F	-	-	-	-	-	-	E	Y	I	R	D	-	Y	0.08	0.35	0.07	1305	
ブローシ-477	F	F	-	-	-	-	-	-	-	-	I	I	-	D	0.09	0.35	0.10	1306	
ブローシ-478	-	L	-	-	-	-	K	G	G	P	T	Y	N	-	S	0.08	0.35	0.10	1307
ブローシ-479	L	A	-	W	-	V	W	E	-	P	G	H	-	D	0.11	0.35	0.10	1308	
ブローシ-480	D	-	-	-	-	-	V	E	D	V	N	D	-	Y	0.07	0.35	0.08	1309	
ブローシ-481	D	-	-	-	-	-	-	E	-	A	H	Y	-	N	0.08	0.35	0.07	1310	
ブローシ-482	-	L	-	-	-	-	L	-	-	T	L	T	-	I	0.08	0.35	0.07	1311	

【 0 7 5 0】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1 3】

ブローシ-483	Y	-	-	-	-	-	I	E	D	Y	N	L	-	N	0.10	0.34	0.09	1312	
ブローシ-484	Y	I	-	-	-	-	V	E	-	Y	Y	N	-	F	0.13	0.34	0.14	1313	
ブローシ-485	D	I	-	-	-	-	L	-	-	-	I	F	-	F	0.08	0.34	0.09	1314	
ブローシ-486	D	I	-	-	-	-	V	E	-	D	Y	L	-	Y	0.07	0.34	0.08	1315	
ブローシ-487	T	L	-	-	-	-	-	E	-	D	A	P	-	I	0.10	0.34	0.08	1316	
ブローシ-488	N	-	-	W	-	D	W	E	Y	I	N	S	-	V	0.14	0.34	0.09	1317	
ブローシ-489	N	D	-	-	-	-	V	E	-	Y	Y	Y	-	T	0.07	0.34	0.09	1318	
ブローシ-490	I	T	-	-	-	-	M	-	-	-	I	D	-	N	0.08	0.34	0.08	1319	
ブローシ-491	Y	-	-	-	-	-	M	A	-	D	L	T	-	D	0.10	0.34	0.29	1320	
ブローシ-492	I	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	V	-	T	0.11	0.33	0.09	1321	
ブローシ-493	H	T	-	W	-	D	W	E	W	D	-	Y	-	D	0.08	0.33	0.07	1322	
ブローシ-494	I	H	-	-	-	-	W	E	L	I	D	D	-	L	0.08	0.33	0.10	1323	
ブローシ-495	Y	T	-	-	-	-	L	-	-	-	I	T	-	T	0.08	0.33	0.08	1324	
ブローシ-496	F	H	-	-	-	-	V	E	-	T	-	Y	-	F	0.11	0.33	0.09	1325	
ブローシ-497	D	-	-	-	-	-	L	-	-	-	L	I	-	N	0.07	0.33	0.08	1326	
ブローシ-498	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	Y	-	I	0.08	0.33	0.10	1327	
ブローシ-499	D	L	-	-	-	-	I	E	-	D	L	V	-	T	0.09	0.33	0.09	1328	
ブローシ-500	N	I	-	-	-	-	L	Q	-	D	I	V	-	P	0.09	0.33	0.09	1329	
ブローシ-501	N	N	-	-	-	-	M	-	-	-	I	T	-	Y	0.08	0.33	0.08	1330	
ブローシ-502	H	T	-	-	-	-	L	-	-	-	I	V	-	V	0.08	0.33	0.08	1331	
ブローシ-503	Y	-	-	-	-	-	I	E	D	I	L	V	-	T	0.12	0.33	0.23	1332	
ブローシ-504	N	T	-	-	-	-	-	E	F	V	H	L	-	P	0.07	0.33	0.11	1333	
ブローシ-505	D	I	-	-	-	-	M	-	-	-	T	V	-	D	0.10	0.33	0.09	1334	
ブローシ-506	A	I	-	-	-	-	V	E	I	V	N	Y	-	Y	0.09	0.32	0.07	1335	
ブローシ-507	H	L	-	-	-	-	V	E	D	P	T	A	-	V	0.10	0.32	0.28	1336	
ブローシ-508	A	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	S	-	T	0.10	0.32	0.09	1337	
ブローシ-509	F	D	-	-	-	-	L	-	-	-	-	I	-	D	0.07	0.32	0.09	1338	
ブローシ-510	D	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	D	-	N	0.10	0.32	0.08	1339
ブローシ-511	Y	L	-	-	-	-	V	E	-	I	S	I	-	F	0.08	0.32	0.07	1340	
ブローシ-512	S	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	H	-	V	0.10	0.31	0.30	1341
ブローシ-513	H	L	-	W	-	D	W	E	-	D	S	A	-	N	0.08	0.31	0.08	1342	
ブローシ-514	H	T	-	W	-	D	W	E	Y	D	Y	D	-	F	0.10	0.31	0.08	1343	
ブローシ-515	Y	D	-	-	-	-	W	E	-	V	A	L	-	N	0.10	0.31	0.10	1344	
ブローシ-516	T	L	-	-	-	-	I	E	-	Y	I	V	-	Y	0.09	0.31	0.23	1345	
ブローシ-517	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	F	-	T	0.09	0.31	0.09	1346
ブローシ-518	D	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	H	-	Y	0.08	0.31	0.08	1347
ブローシ-519	L	F	-	-	-	-	-	E	-	A	Y	L	-	I	0.08	0.31	0.08	1348	
ブローシ-520	I	F	-	-	-	-	I	E	-	D	F	V	-	T	0.10	0.31	0.10	1349	
ブローシ-521	D	D	-	-	-	-	W	E	Y	Y	-	A	-	V	0.08	0.31	0.08	1350	
ブローシ-522	D	D	-	-	-	-	L	-	-	T	T	I	-	Y	0.10	0.31	0.09	1351	
ブローシ-523	A	S	-	-	-	-	L	-	-	-	I	A	-	D	0.10	0.31	0.09	1352	

【 0 7 5 1】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1 4】

ブローシ524	Y	L	-	-	-	-	V	E	D	Y	D	Y	-	Y	0.08	0.31	0.09	1353	
ブローシ525	D	L	-	-	-	-	W	E	-	T	I	F	-	A	0.12	0.30	0.09	1354	
ブローシ526	D	F	-	-	-	D	G	E	-	F	Y	I	-	P	0.12	0.30	0.11	1355	
ブローシ527	-	-	-	-	-	-	V	E	-	N	I	L	-	H	0.15	0.30	0.17	1356	
ブローシ528	D	-	-	-	-	-	V	E	-	N	Y	F	-	F	0.12	0.30	0.21	1357	
ブローシ529	N	D	-	W	-	D	W	Y	-	F	L	S	-	D	0.10	0.30	0.10	1358	
ブローシ530	R	D	-	W	-	D	W	E	V	P	Y	F	-	D	0.08	0.30	0.09	1359	
ブローシ531	N	L	-	-	-	-	V	E	-	A	-	Y	-	Y	0.10	0.30	0.13	1360	
ブローシ532	F	D	-	W	-	D	G	E	L	N	Y	L	-	T	0.23	0.30	0.08	1361	
ブローシ533	Y	-	-	-	-	-	V	E	D	V	N	L	-	I	0.18	0.30	0.10	1362	
ブローシ534	D	N	-	-	-	-	Y	-	-	-	I	T	-	L	0.11	0.29	0.09	1363	
ブローシ535	L	N	-	W	-	D	W	E	-	D	Y	S	-	N	0.09	0.29	0.09	1364	
ブローシ536	P	T	-	-	-	-	V	E	-	L	L	S	-	N	0.12	0.29	0.26	1365	
ブローシ537	D	H	-	-	-	-	V	E	L	I	F	Y	-	H	0.11	0.29	0.08	1366	
ブローシ538	F	H	-	-	-	-	L	-	-	-	I	F	-	Y	0.08	0.29	0.08	1367	
ブローシ539	F	D	-	-	-	-	L	E	-	T	-	V	-	P	0.16	0.29	0.16	1368	
ブローシ540	D	F	-	-	-	-	L	-	-	-	L	P	-	A	0.08	0.29	0.08	1369	
ブローシ541	D	S	-	-	-	-	L	-	-	-	I	Y	-	D	0.09	0.29	0.09	1370	
ブローシ542	A	D	-	W	-	D	W	E	-	F	L	L	-	F	0.12	0.29	0.10	1371	
ブローシ543	I	L	-	-	-	-	V	E	-	L	D	F	-	N	0.10	0.28	0.08	1372	
ブローシ544	F	F	-	-	-	-	E	-	I	F	L	-	Y	0.09	0.28	0.07	1373		
ブローシ545	Y	N	-	-	-	D	G	-	-	-	Y	D	-	H	0.07	0.28	0.07	1374	
ブローシ546	D	N	-	-	-	-	L	-	-	T	I	T	-	F	0.11	0.28	0.11	1375	
ブローシ547	H	N	-	-	-	D	G	-	-	A	F	I	-	N	0.09	0.28	0.23	1376	
ブローシ548	D	-	-	-	-	-	V	E	-	D	L	V	-	P	0.10	0.28	0.23	1377	
ブローシ549	D	-	-	-	-	-	L	-	-	-	L	N	-	F	0.08	0.28	0.07	1378	
ブローシ550	D	-	-	-	-	-	-	Q	-	D	F	H	-	H	0.11	0.28	0.27	1379	
ブローシ551	Y	D	-	-	-	-	W	E	F	T	D	D	-	I	0.10	0.28	0.18	1380	
ブローシ552	D	I	-	-	-	-	Y	E	-	D	I	I	-	Y	0.14	0.28	0.19	1381	
ブローシ553	F	D	-	-	-	-	L	-	-	T	-	P	-	P	0.11	0.28	0.08	1382	
ブローシ554	N	-	-	-	-	-	L	-	-	T	S	V	-	D	0.09	0.28	0.26	1383	
ブローシ555	Y	-	-	-	-	-	W	E	F	-	F	D	-	D	0.17	0.28	0.11	1384	
ブローシ556	Y	A	-	-	-	-	L	-	-	-	-	T	-	D	0.09	0.28	0.08	1385	
ブローシ557	F	L	-	-	-	-	V	E	Q	D	Y	F	-	V	0.08	0.28	0.10	1386	
ブローシ558	D	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	0.09	0.27	0.26	1387	
ブローシ559	N	D	-	-	-	D	G	I	-	T	-	D	-	Y	0.10	0.27	0.24	1388	
ブローシ560	Y	F	-	-	-	-	V	E	D	Y	N	D	-	F	0.08	0.27	0.09	1389	
ブローシ561	N	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	F	-	Y	0.10	0.27	0.07	1390
ブローシ562	I	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	I	P	-	T	0.10	0.27	0.08	1391	
ブローシ563	I	-	-	-	-	D	G	-	-	-	F	I	-	A	0.07	0.27	0.08	1392	
ブローシ564	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	0.08	0.27	0.07	1393	

10

20

30

40

【0 7 5 2】

50

【表 3 4 - 1 5】

ブローシ-560	-	F	-	-	-	-	W	E	D	I	T	D	-	D	0.13	0.27	0.09	1394	
ブローシ-566	L	D	-	-	-	-	V	-	-	T	F	T	-	H	0.08	0.26	0.08	1395	
ブローシ-567	D	D	-	-	-	-	Y	-	-	-	F	A	-	H	0.13	0.26	0.10	1396	
ブローシ-568	I	-	-	-	-	-	Y	Q	-	D	L	P	-	N	0.12	0.26	0.11	1397	
ブローシ-569	L	D	-	-	-	-	V	E	-	Y	N	Y	-	V	0.09	0.26	0.08	1398	
ブローシ-570	Y	V	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	-	N	0.14	0.26	0.08	1399	
ブローシ-571	T	P	-	-	-	-	L	E	-	A	I	-	-	Y	0.10	0.26	0.10	1400	
ブローシ-572	Y	F	-	-	-	-	-	-	-	-	A	D	-	N	0.08	0.26	0.08	1401	
ブローシ-573	D	D	-	-	-	-	-	E	-	D	I	T	-	D	0.12	0.26	0.25	1402	
ブローシ-574	L	-	-	-	-	-	V	V	E	-	L	N	H	-	N	0.08	0.26	0.09	1403
ブローシ-575	-	I	-	-	-	-	D	G	E	-	L	I	A	-	A	0.09	0.26	0.27	1404
ブローシ-576	F	A	-	W	-	-	D	W	Q	-	T	Y	V	-	N	0.09	0.25	0.08	1405
ブローシ-577	Y	I	-	-	-	-	V	E	F	L	F	F	-	N	0.08	0.25	0.08	1406	
ブローシ-578	T	Q	-	-	-	-	K	G	E	P	T	Y	H	-	Y	0.12	0.25	0.12	1407
ブローシ-579	N	-	-	-	-	-	V	E	-	Y	H	N	-	D	0.10	0.25	0.17	1408	
ブローシ-580	-	-	-	-	-	-	W	E	F	F	S	D	-	A	0.08	0.25	0.07	1409	
ブローシ-581	F	-	-	-	-	-	L	E	-	-	F	F	-	Y	0.10	0.25	0.22	1410	
ブローシ-582	D	-	-	-	-	-	I	E	-	N	F	Y	-	Y	0.13	0.25	0.09	1411	
ブローシ-583	Y	A	-	-	-	-	V	E	-	Y	-	Y	-	A	0.08	0.25	0.09	1412	
ブローシ-584	-	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	I	-	D	0.08	0.25	0.07	1413	
ブローシ-585	N	D	-	-	-	-	M	-	-	-	I	A	-	Y	0.07	0.25	0.07	1414	
ブローシ-586	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	L	A	-	A	0.09	0.25	0.21	1415
ブローシ-587	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	N	-	D	0.08	0.25	0.09	1416
ブローシ-588	L	T	-	W	-	-	D	W	E	-	D	F	F	-	N	0.07	0.24	0.07	1417
ブローシ-589	F	-	-	-	-	-	Q	E	-	I	N	Y	-	Y	0.10	0.24	0.23	1418	
ブローシ-590	T	-	-	-	-	-	L	E	-	F	F	L	-	Y	0.13	0.24	0.08	1419	
ブローシ-591	P	D	-	-	-	-	L	-	-	-	-	A	-	H	0.12	0.24	0.09	1420	
ブローシ-592	N	D	-	-	-	-	-	E	-	I	I	F	-	V	0.09	0.24	0.24	1421	
ブローシ-593	Y	I	-	-	-	-	-	-	-	-	F	Y	-	N	0.25	0.24	0.08	1422	
ブローシ-594	H	A	-	-	-	-	L	-	-	-	L	L	-	N	0.20	0.24	0.07	1423	
ブローシ-595	Y	-	-	-	-	-	W	E	-	A	-	L	-	A	0.09	0.24	0.21	1424	
ブローシ-596	A	F	-	-	-	-	V	E	-	Y	D	L	-	N	0.10	0.24	0.16	1425	
ブローシ-597	Y	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	S	0.15	0.23	0.09	1426	
ブローシ-598	Y	L	-	-	-	-	V	E	D	D	T	L	-	A	0.08	0.23	0.09	1427	
ブローシ-599	A	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	0.08	0.23	0.08	1428	
ブローシ-600	N	-	-	-	-	-	W	E	V	Y	S	L	-	P	0.13	0.23	0.08	1429	
ブローシ-601	D	F	-	-	-	-	V	E	-	D	T	Y	-	H	0.07	0.23	0.07	1430	
ブローシ-602	I	S	-	-	-	-	Y	E	W	D	Y	A	-	N	0.08	0.23	0.10	1431	
ブローシ-603	-	N	-	-	-	-	L	-	-	-	I	I	-	Y	0.08	0.23	0.08	1432	
ブローシ-604	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	P	-	Y	0.07	0.23	0.08	1433
ブローシ-605	Y	L	-	-	-	-	-	E	-	N	F	L	-	T	0.09	0.23	0.22	1434	

【 0 7 5 3】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1 6】

ブー-24006	F	D	-	-	-	-	V	-	-	-	-	D	-	A	0.08	0.22	0.09	1435	
ブー-24007	Y	D	-	-	-	-	Q	E	-	I	S	F	-	N	0.09	0.22	0.09	1436	
ブー-24008	I	D	-	-	-	-	I	E	L	Y	D	D	-	F	0.09	0.22	0.09	1437	
ブー-24009	T	F	-	-	-	-	L	-	-	-	-	Y	-	Y	0.08	0.22	0.07	1438	
ブー-24010	F	F	-	-	-	-	I	-	-	-	N	A	-	V	0.09	0.22	0.07	1439	
ブー-24011	Y	H	-	W	-	D	W	E	P	I	Y	I	-	I	0.12	0.22	0.10	1440	
ブー-24012	A	I	-	-	-	-	Y	E	-	D	H	Y	-	Y	0.08	0.22	0.08	1441	
ブー-24013	P	L	-	-	-	-	D	G	F	-	N	Y	N	-	F	0.12	0.22	0.08	1442
ブー-24014	F	P	-	W	-	D	W	E	W	D	N	N	-	H	0.09	0.22	0.09	1443	
ブー-24015	-	D	-	-	-	-	D	G	-	-	L	A	A	-	H	0.10	0.22	0.11	1444
ブー-24016	-	D	-	W	-	D	W	E	-	Y	Y	S	-	D	0.08	0.22	0.07	1445	
ブー-24017	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	Y	D	-	T	0.07	0.21	0.10	1446	
ブー-24018	N	L	-	-	-	-	W	E	N	F	A	D	-	F	0.08	0.21	0.08	1447	
ブー-24019	Y	L	-	-	-	-	L	E	V	F	F	V	-	D	0.12	0.21	0.10	1448	
ブー-24020	I	F	-	-	-	-	L	E	D	Y	S	I	-	F	0.09	0.21	0.08	1449	
ブー-24021	D	-	-	-	-	-	L	E	Q	Y	D	L	-	F	0.09	0.21	0.08	1450	
ブー-24022	L	L	-	-	-	-	V	N	E	D	P	L	D	-	Y	0.11	0.21	0.13	1451
ブー-24023	I	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	0.08	0.21	0.08	1452	
ブー-24024	I	I	-	-	-	-	V	E	-	I	D	I	-	S	0.08	0.21	0.08	1453	
ブー-24025	I	A	-	W	-	D	W	E	D	Y	S	S	-	P	0.08	0.21	0.11	1454	
ブー-24026	Y	-	-	-	-	-	V	E	D	I	N	D	-	I	0.09	0.21	0.07	1455	
ブー-24027	N	I	-	-	-	-	M	-	-	-	I	D	-	I	0.08	0.21	0.07	1456	
ブー-24028	F	D	-	W	-	D	W	E	-	L	-	S	-	Y	0.07	0.21	0.08	1457	
ブー-24029	Y	F	-	-	-	-	W	E	D	H	F	F	-	D	0.09	0.21	0.19	1458	
ブー-24030	T	-	-	-	-	-	-	E	-	D	S	Y	-	D	0.12	0.20	0.09	1459	
ブー-24031	N	L	-	-	-	-	V	E	L	I	D	I	-	S	0.11	0.20	0.09	1460	
ブー-24032	D	N	-	-	-	-	W	E	-	V	Y	L	-	N	0.08	0.20	0.08	1461	
ブー-24033	F	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	L	-	F	0.08	0.20	0.09	1462
ブー-24034	H	I	-	-	-	-	Q	-	-	-	I	-	-	T	0.09	0.20	0.19	1463	
ブー-24035	F	D	-	W	-	D	W	E	D	N	S	Y	-	D	0.10	0.20	0.09	1464	
ブー-24036	T	A	-	-	-	-	W	E	F	D	F	N	-	D	0.08	0.20	0.07	1465	
ブー-24037	H	H	-	W	-	D	W	E	D	Y	S	T	-	P	0.10	0.20	0.11	1466	
ブー-24038	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	0.07	0.20	0.08	1467	
ブー-24039	L	H	-	W	-	D	W	E	-	I	D	I	-	D	0.08	0.20	0.09	1468	
ブー-24040	D	I	-	-	-	-	D	G	Q	-	D	F	V	-	S	0.08	0.20	0.09	1469
ブー-24041	D	V	-	W	-	D	W	E	V	N	Y	F	-	D	0.09	0.20	0.07	1470	
ブー-24042	-	N	-	-	-	-	M	-	-	-	I	D	-	A	0.12	0.20	0.10	1471	
ブー-24043	D	N	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T	V	-	N	0.11	0.19	0.19	1472
ブー-24044	D	L	-	-	-	-	-	E	-	V	H	N	-	N	0.08	0.19	0.08	1473	
ブー-24045	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	Y	-	F	0.13	0.19	0.09	1474
ブー-24046	N	I	-	W	-	D	W	E	-	D	N	F	-	S	0.08	0.19	0.08	1475	

【 0 7 5 4】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1 7】

ブローンJ-647	F	V	-	-	-	-	W	E	V	Y	D	D	-	D	0.08	0.19	0.08	1476
ブローンJ-648	A	-	-	-	-	-	L	E	V	V	H	L	-	V	0.10	0.19	0.17	1477
ブローンJ-649	P	F	-	-	-	-	M	-	-	T	I	D	-	Y	0.07	0.19	0.09	1478
ブローンJ-650	L	L	-	-	-	V	M	E	D	V	F	A	-	Y	0.08	0.19	0.08	1479
ブローンJ-651	D	L	-	-	-	-	-	-	-	-	T	N	-	Y	0.07	0.19	0.08	1480
ブローンJ-652	H	D	-	-	-	-	M	E	-	Y	Y	L	-	P	0.10	0.18	0.10	1481
ブローンJ-653	T	D	-	-	-	-	Y	-	-	-	I	I	-	P	0.08	0.18	0.09	1482
ブローンJ-654	-	L	-	W	-	D	W	E	D	Y	A	D	-	N	0.09	0.18	0.08	1483
ブローンJ-655	N	D	-	-	-	-	L	-	-	-	L	T	-	D	0.07	0.18	0.09	1484
ブローンJ-656	I	-	-	-	-	-	L	-	-	-	I	A	-	Y	0.11	0.18	0.08	1485
ブローンJ-657	N	-	-	-	-	-	V	E	-	F	N	F	-	H	0.11	0.18	0.14	1486
ブローンJ-658	D	V	-	-	-	-	I	E	-	Y	S	F	-	I	0.08	0.18	0.09	1487
ブローンJ-659	D	L	-	-	-	-	V	E	-	I	T	D	-	A	0.10	0.18	0.12	1488
ブローンJ-660	H	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	0.12	0.18	0.12	1489
ブローンJ-661	P	L	-	-	-	V	L	E	-	D	I	Y	-	Y	0.10	0.18	0.13	1490
ブローンJ-662	D	L	-	-	-	-	-	E	D	I	I	D	-	N	0.10	0.18	0.11	1491
ブローンJ-663	D	-	-	-	-	-	V	E	V	P	S	N	-	N	0.10	0.18	0.18	1492
ブローンJ-664	I	I	-	-	-	-	L	-	-	-	T	A	-	D	0.10	0.18	0.09	1493
ブローンJ-665	D	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	0.10	0.18	0.14	1494
ブローンJ-666	F	D	-	-	-	-	-	-	-	-	L	Y	-	S	0.07	0.18	0.07	1495
ブローンJ-667	F	A	-	W	-	D	W	E	-	V	Y	I	-	Y	0.08	0.18	0.08	1496
ブローンJ-668	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	D	-	S	0.08	0.18	0.09	1497
ブローンJ-669	D	L	-	-	-	-	L	E	-	A	F	L	-	A	0.09	0.18	0.08	1498
ブローンJ-670	F	A	-	-	-	-	L	-	-	T	L	T	-	L	0.10	0.18	0.08	1499
ブローンJ-671	F	D	-	-	-	-	V	E	-	I	S	N	-	D	0.17	0.18	0.10	1500
ブローンJ-672	-	H	-	-	-	-	L	E	Y	P	F	D	-	N	0.09	0.17	0.16	1501
ブローンJ-673	A	-	-	-	-	-	-	E	-	H	T	T	-	N	0.10	0.17	0.15	1502
ブローンJ-674	L	-	-	-	-	V	S	E	Q	F	T	F	-	I	0.08	0.17	0.08	1503
ブローンJ-675	D	-	-	-	-	-	L	-	-	-	Y	D	-	N	0.10	0.17	0.09	1504
ブローンJ-676	F	-	-	-	-	-	W	E	-	F	D	V	-	I	0.13	0.17	0.15	1505
ブローンJ-677	F	T	-	-	-	-	V	E	-	Y	D	H	-	I	0.08	0.17	0.09	1506
ブローンJ-678	Y	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	0.12	0.17	0.11	1507
ブローンJ-679	A	V	-	-	-	-	N	-	-	-	N	S	-	A	0.08	0.17	0.08	1508
ブローンJ-680	I	-	-	W	-	D	W	E	V	P	N	D	-	A	0.10	0.17	0.09	1509
ブローンJ-681	Y	F	-	-	-	-	-	E	-	F	F	H	-	Y	0.12	0.17	0.12	1510
ブローンJ-682	Y	V	-	-	-	D	G	-	-	-	S	F	-	D	0.12	0.17	0.12	1511
ブローンJ-683	I	S	-	-	-	-	V	E	-	F	F	Y	-	Y	0.10	0.17	0.08	1512
ブローンJ-684	L	I	-	-	-	V	-	E	-	D	-	Y	-	D	0.17	0.17	0.15	1513
ブローンJ-685	-	-	-	-	-	-	V	E	D	H	N	Y	-	A	0.14	0.17	0.16	1514
ブローンJ-686	L	D	-	-	-	-	-	E	F	V	Y	I	-	A	0.08	0.17	0.10	1515
ブローンJ-687	Y	D	-	-	-	-	-	E	-	D	L	P	-	I	0.17	0.17	0.11	1516

【 0 7 5 5】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1 8】

ブローシ-688	D	V	-	-	-	-	V	E	-	D	Y	Y	-	D	0.10	0.17	0.14	1517	
ブローシ-688	N	D	-	W	-	D	W	E	Y	D	N	V	-	V	0.08	0.17	0.10	1518	
ブローシ-689	D	L	-	-	-	-	E	V	A	N	D	-	N	0.10	0.16	0.16	1519		
ブローシ-691	H	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	S	-	N	0.09	0.16	0.07	1520	
ブローシ-692	L	D	-	W	-	D	W	E	-	T	T	H	-	D	0.08	0.16	0.08	1521	
ブローシ-693	I	I	-	-	-	-	V	E	-	D	D	Y	-	L	0.09	0.16	0.09	1522	
ブローシ-694	Y	-	-	W	-	D	W	E	-	V	I	I	-	D	0.09	0.16	0.09	1523	
ブローシ-695	F	D	-	-	-	-	I	-	-	Y	T	N	-	N	0.12	0.16	0.09	1524	
ブローシ-696	I	T	-	-	-	-	L	-	-	T	I	N	-	D	0.08	0.16	0.11	1525	
ブローシ-697	D	S	-	-	-	-	V	E	-	D	I	Y	-	I	0.07	0.16	0.08	1526	
ブローシ-698	Y	L	-	-	-	-	-	-	-	-	G	N	-	H	0.07	0.16	0.08	1527	
ブローシ-699	D	N	-	-	-	-	L	P	-	D	Y	F	-	D	0.08	0.16	0.10	1528	
ブローシ-700	-	L	-	-	-	-	-	E	-	V	S	N	-	N	0.11	0.16	0.08	1529	
ブローシ-701	-	D	-	W	-	D	W	E	-	D	I	V	-	D	0.10	0.16	0.09	1530	
ブローシ-702	-	-	-	W	-	D	W	E	D	N	F	P	-	Y	0.07	0.16	0.07	1531	
ブローシ-703	D	-	-	-	-	-	V	E	-	H	F	N	-	H	0.08	0.16	0.08	1532	
ブローシ-704	A	D	-	-	-	-	I	E	-	D	A	Y	-	Y	0.12	0.16	0.09	1533	
ブローシ-705	I	L	-	W	-	D	W	E	D	A	T	F	-	Y	0.09	0.16	0.07	1534	
ブローシ-706	I	H	-	W	-	D	W	E	D	F	N	I	-	P	0.09	0.16	0.08	1535	
ブローシ-707	T	I	-	-	-	-	V	E	D	Y	N	D	-	I	0.07	0.16	0.07	1536	
ブローシ-708	D	D	-	-	-	-	L	-	-	-	-	A	-	I	0.08	0.16	0.08	1537	
ブローシ-709	D	D	-	W	-	D	W	E	D	H	I	F	-	F	0.13	0.16	0.08	1538	
ブローシ-710	-	N	-	-	-	-	V	E	-	I	I	F	-	D	0.12	0.15	0.12	1539	
ブローシ-711	I	F	-	W	-	D	W	E	D	D	T	V	-	I	0.08	0.15	0.09	1540	
ブローシ-712	I	I	-	-	-	-	-	E	-	I	S	D	-	L	0.12	0.15	0.15	1541	
ブローシ-713	F	D	-	-	-	-	V	E	-	Y	N	D	-	D	0.11	0.15	0.09	1542	
ブローシ-714	N	D	-	-	-	-	L	-	-	T	L	Y	-	I	0.08	0.15	0.10	1543	
ブローシ-715	A	I	-	-	-	-	L	E	-	D	I	S	-	N	0.12	0.15	0.17	1544	
ブローシ-716	H	L	-	-	-	-	-	-	-	-	T	N	-	Y	0.07	0.15	0.07	1545	
ブローシ-717	S	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	A	-	I	0.10	0.15	0.11	1546	
ブローシ-718	L	-	-	-	-	-	-	E	Q	L	A	D	-	T	0.08	0.15	0.08	1547	
ブローシ-719	I	D	-	-	-	-	L	-	-	-	I	A	-	N	0.07	0.15	0.08	1548	
ブローシ-720	F	D	-	-	-	-	D	G	Q	-	D	L	V	-	N	0.10	0.15	0.08	1549
ブローシ-721	N	L	-	-	-	-	-	E	-	F	F	D	-	Y	0.09	0.15	0.15	1550	
ブローシ-722	S	I	-	-	-	-	L	Q	-	D	I	V	-	P	0.09	0.14	0.14	1551	
ブローシ-723	N	P	-	-	-	-	Y	-	-	-	A	H	-	D	0.08	0.14	0.08	1552	
ブローシ-724	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	Y	Y	N	-	N	0.12	0.14	0.11	1553	
ブローシ-725	-	D	-	-	-	-	L	-	-	T	I	F	-	D	0.07	0.14	0.08	1554	
ブローシ-726	D	N	-	-	-	-	L	-	-	-	-	T	-	T	0.09	0.14	0.10	1555	
ブローシ-727	-	D	-	-	-	-	L	-	-	-	S	Y	-	D	0.10	0.14	0.13	1556	
ブローシ-728	Y	-	-	-	-	-	-	E	F	I	D	F	-	F	0.07	0.14	0.07	1557	

【 0 7 5 6】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 1 9】

ブローシ-728	Y	D	-	W	-	D	W	E	V	I	T	Y	-	N	0.08	0.14	0.09	1558
ブローシ-729	F	D	-	-	-	-	I	E	-	D	F	F	-	V	0.06	0.14	0.07	1559
ブローシ-731	I	F	-	W	-	D	W	-	D	I	N	F	-	D	0.10	0.14	0.14	1560
ブローシ-732	N	F	-	-	-	-	L	P	-	D	I	T	-	Y	0.37	0.14	0.09	1561
ブローシ-733	S	L	-	-	-	-	-	E	-	Y	Y	H	-	L	0.09	0.14	0.07	1562
ブローシ-734	A	S	-	-	-	-	L	-	-	-	L	D	-	L	0.12	0.14	0.13	1563
ブローシ-735	S	F	-	-	-	-	R	E	W	D	L	A	-	Y	0.09	0.14	0.08	1564
ブローシ-736	H	L	-	-	-	-	-	E	D	V	L	D	-	I	0.08	0.14	0.12	1565
ブローシ-737	L	D	-	-	-	D	G	-	-	F	Y	Y	-	L	0.20	0.14	0.09	1566
ブローシ-738	D	N	-	W	-	D	W	E	-	D	I	A	-	T	0.16	0.14	0.11	1567
ブローシ-739	S	D	-	-	-	-	L	-	-	T	I	H	-	I	0.09	0.14	0.08	1568
ブローシ-740	N	S	-	-	-	D	G	-	-	-	-	D	-	L	0.08	0.14	0.08	1569
ブローシ-741	D	L	-	-	-	-	L	-	-	-	T	L	-	I	0.07	0.14	0.08	1570
ブローシ-742	F	D	-	-	-	-	S	-	-	-	F	N	-	Y	0.09	0.14	0.11	1571
ブローシ-743	D	L	-	-	-	-	-	E	-	D	D	I	-	Y	0.12	0.14	0.13	1572
ブローシ-744	H	A	-	-	-	-	-	E	-	D	T	Y	-	F	0.10	0.14	0.14	1573
ブローシ-745	S	D	-	-	-	-	L	-	-	-	-	A	-	I	0.11	0.14	0.08	1574
ブローシ-746	I	V	-	-	-	-	L	P	-	D	Y	N	-	Y	0.09	0.13	0.11	1575
ブローシ-747	D	L	-	-	-	-	-	-	-	-	F	I	-	F	0.09	0.13	0.08	1576
ブローシ-748	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	T	L	T	-	N	0.13	0.13	0.08	1577
ブローシ-749	Y	D	-	-	-	-	V	E	-	I	-	N	-	D	0.11	0.13	0.12	1578
ブローシ-750	-	F	-	-	-	-	I	E	D	D	H	V	-	I	0.07	0.13	0.07	1579
ブローシ-751	F	I	-	-	-	-	W	E	D	D	Y	A	-	S	0.12	0.13	0.12	1580
ブローシ-752	N	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	0.10	0.13	0.09	1581
ブローシ-753	N	L	-	-	-	-	V	E	-	I	L	I	-	D	0.07	0.13	0.07	1582
ブローシ-754	D	S	-	-	-	-	V	E	-	Y	D	L	-	N	0.11	0.13	0.08	1583
ブローシ-755	T	L	-	-	-	-	-	E	-	I	T	D	-	N	0.09	0.13	0.08	1584
ブローシ-756	T	V	-	-	-	K	M	E	M	N	S	T	-	D	0.09	0.13	0.09	1585
ブローシ-757	-	H	-	W	-	D	W	E	D	A	-	S	-	N	0.10	0.12	0.11	1586
ブローシ-758	D	L	-	-	-	D	G	N	-	L	D	F	-	F	0.08	0.12	0.08	1587
ブローシ-759	D	L	-	-	-	D	G	E	-	H	Y	Y	-	D	0.09	0.12	0.07	1588
ブローシ-760	F	N	-	-	-	-	V	E	-	I	L	L	-	T	0.11	0.12	0.12	1589
ブローシ-761	H	-	-	-	-	-	V	E	N	I	N	D	-	I	0.09	0.12	0.07	1590
ブローシ-762	I	D	-	-	-	-	L	-	-	-	-	I	-	D	0.09	0.12	0.08	1591
ブローシ-763	I	F	-	-	-	-	I	E	Q	P	A	L	-	Y	0.08	0.12	0.09	1592
ブローシ-764	Y	D	-	-	-	-	-	Q	-	D	L	V	-	P	0.10	0.12	0.08	1593
ブローシ-765	H	A	-	W	-	D	W	E	-	P	N	Y	-	D	0.13	0.12	0.09	1594
ブローシ-766	N	V	-	W	-	D	W	E	-	D	Y	N	-	Y	0.11	0.12	0.10	1595
ブローシ-767	S	F	-	-	Q	-	L	G	D	N	Y	D	-	I	0.09	0.12	0.12	1596
ブローシ-768	D	D	-	-	-	-	L	-	-	T	T	V	-	Y	0.08	0.12	0.09	1597
ブローシ-769	N	F	-	-	-	-	W	E	V	A	T	L	-	L	0.09	0.12	0.14	1598

【0 7 5 7】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 2 0】

1599	D	L	-	-	-	-	V	E	-	D	T	Y	-	N	0.09	0.11	0.07	1599
1600	A	L	-	-	-	-	V	E	Q	V	D	L	-	T	0.08	0.11	0.08	1600
1601	D	D	-	-	-	-	L	-	-	-	-	N	-	N	0.08	0.11	0.08	1601
1602	I	F	-	-	-	-	E	Q	I	I	Y	-	D		0.09	0.11	0.11	1602
1603	S	D	-	W	-	D	W	E	-	V	Y	Y	-	S	0.09	0.11	0.10	1603
1604	F	F	-	-	-	D	G	-	-	V	A	I	-	D	0.09	0.11	0.07	1604
1605	D	D	-	W	-	D	W	E	D	D	-	Y	-	Y	0.11	0.11	0.07	1605
1606	Y	D	-	-	-	-	-	-	-	T	-	V	-	P	0.08	0.11	0.08	1606
1607	S	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	N	-	V	0.10	0.11	0.08	1607
1608	A	F	-	V	S	F	Q	Q	S	L	P	H	-	D	0.09	0.11	0.10	1608
1609	-	N	-	-	-	-	V	E	-	Y	F	V	-	F	0.09	0.11	0.09	1609
1610	T	N	-	W	-	D	W	E	-	D	F	A	-	V	0.07	0.11	0.08	1610
1611	D	D	-	-	-	-	E	-	I	I	L	-	F		0.08	0.10	0.08	1611
1612	N	S	-	-	-	-	L	E	D	Y	H	L	-	P	0.08	0.10	0.10	1612
1613	I	H	-	-	-	D	S	-	G	F	D	F	-	D	0.09	0.10	0.08	1613
1614	F	D	-	-	-	-	L	E	-	D	H	L	-	F	0.08	0.10	0.08	1614
1615	T	V	-	W	-	D	-	E	-	Y	A	D	-	D	0.10	0.10	0.08	1615
1616	Y	F	-	W	-	D	W	E	-	A	A	D	-	L	0.09	0.10	0.09	1616
1617	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	I	0.08	0.10	0.07	1617
1618	A	V	-	-	-	-	L	P	-	D	I	V	-	Y	0.08	0.10	0.08	1618
1619	-	L	-	-	-	-	V	E	-	Y	H	L	-	A	0.08	0.10	0.30	1619
1620	S	L	-	W	-	D	W	E	-	V	D	N	-	F	0.12	0.10	0.11	1620
1621	T	I	-	-	-	D	G	Q	-	D	Y	N	-	H	0.07	0.10	0.07	1621
1622	F	L	-	-	-	-	G	E	P	T	Y	L	-	T	0.12	0.10	0.09	1622
1623	D	D	-	W	L	-	Q	H	D	I	Y	V	-	A	0.10	0.10	0.08	1623
1624	I	F	-	-	-	-	V	E	-	V	A	F	-	F	0.07	0.10	0.08	1624
1625	A	L	-	-	-	-	V	E	D	D	Y	D	-	L	0.09	0.10	0.09	1625
1626	D	D	-	-	-	-	I	E	L	Y	L	T	-	A	0.08	0.10	0.08	1626
1627	T	D	-	W	-	D	W	E	D	D	S	I	-	D	0.07	0.10	0.07	1627
1628	S	I	-	-	-	-	L	E	-	I	F	L	-	N	0.08	0.10	0.08	1628
1629	N	D	-	-	-	-	L	E	-	D	I	L	-	F	0.07	0.10	0.09	1629
1630	D	D	-	-	-	-	L	-	-	T	Y	S	-	Y	0.09	0.09	0.08	1630
1631	F	V	-	-	-	-	W	E	-	I	D	L	-	I	0.10	0.09	0.09	1631
1632	Y	D	-	-	-	-	L	-	-	-	L	S	-	P	0.07	0.09	0.07	1632
1633	N	L	-	-	-	-	L	-	-	-	I	I	-	P	0.08	0.09	0.08	1633
1634	I	D	-	W	-	D	W	E	-	F	N	N	-	F	0.08	0.09	0.09	1634
1635	A	-	-	-	-	-	L	E	-	H	D	Y	-	Y	0.08	0.09	0.09	1635
1636	D	D	-	S	-	Q	-	-	Q	I	D	L	-	D	0.14	0.09	0.09	1636
1637	S	-	-	-	-	-	S	-	-	-	I	Y	-	Y	0.08	0.09	0.07	1637
1638	S	L	-	-	-	-	Q	-	D	A	P	-	N		0.07	0.09	0.07	1638
1639	D	A	-	-	-	-	L	-	-	T	T	H	-	D	0.09	0.09	0.08	1639

【 0 7 5 8】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 2 1】

ブローゾ 811	N	D	-	-	-	-	V	E	-	V	A	D	-	F	0.07	0.09	0.08	1640
ブローゾ 812	Y	I	-	-	-	-	E	Q	D	Y	F	-	F	0.08	0.09	0.08	1641	
ブローゾ 813	T	D	-	-	-	D	G	-	-	T	N	Y	-	F	0.11	0.09	0.08	1642
ブローゾ 814	Y	D	-	-	-	-	V	-	-	-	-	L	-	P	0.08	0.09	0.08	1643
ブローゾ 815	I	D	-	-	-	-	-	-	-	-	A	Y	-	T	0.08	0.09	0.08	1644
ブローゾ 816	F	D	-	-	-	-	E	-	F	F	H	-	Y	0.09	0.09	0.09	1645	
ブローゾ 817	F	P	-	-	-	-	I	E	-	Y	D	Y	-	V	0.09	0.09	0.08	1646
ブローゾ 818	A	D	-	-	-	I	-	E	S	I	D	I	-	V	0.09	0.09	0.07	1647
ブローゾ 819	I	S	-	-	-	D	L	W	P	T	D	I	-	T	0.10	0.09	0.10	1648
ブローゾ 820	D	D	-	-	-	D	G	-	-	V	H	T	-	N	0.09	0.09	0.07	1649
ブローゾ 821	I	D	-	W	-	D	W	E	G	-	F	A	-	N	0.09	0.09	0.08	1650
ブローゾ 822	L	N	-	-	-	D	G	-	-	T	F	Y	-	D	0.08	0.08	0.07	1651
ブローゾ 823	I	H	-	-	-	-	L	G	A	Y	I	S	-	S	0.08	0.08	0.09	1652
ブローゾ 824	T	I	-	W	-	D	W	E	-	D	Y	F	-	Y	0.08	0.08	0.08	1653
ブローゾ 825	H	S	-	L	A	Q	-	-	Q	D	L	V	-	I	0.07	0.08	0.07	1654
ブローゾ 826	N	N	-	A	S	D	L	S	-	D	N	S	-	I	0.07	0.08	0.08	1655
ブローゾ 827	-	N	-	W	-	D	W	E	-	D	-	A	-	N	0.09	0.08	0.07	1656
ブローゾ 828	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	F	Y	-	F	0.08	0.08	0.07	1657
ブローゾ 829	L	F	-	-	T	V	L	-	-	F	F	D	-	D	0.07	0.08	0.07	1658
ブローゾ 830	F	D	-	-	-	-	L	-	-	-	-	S	-	A	0.08	0.08	0.07	1659
ブローゾ 831	Y	-	-	-	-	-	V	E	-	N	-	Y	-	I	0.07	0.08	0.08	1660
ブローゾ 832	D	-	-	-	-	-	L	-	D	-	T	I	-	H	0.12	0.08	0.10	1661
ブローゾ 833	-	F	-	-	-	Q	W	A	-	A	N	A	-	F	0.09	0.08	0.07	1662
ブローゾ 834	F	T	-	-	-	-	Y	-	-	-	I	T	-	P	0.09	0.08	0.09	1663
ブローゾ 835	L	N	-	-	-	V	N	-	-	-	S	V	-	I	0.07	0.08	0.08	1664
ブローゾ 836	A	I	-	W	-	D	W	E	-	F	S	D	-	H	0.07	0.08	0.07	1665
ブローゾ 837	Y	-	-	-	V	D	L	G	A	N	-	Y	-	Y	0.10	0.08	0.09	1666
ブローゾ 838	H	-	-	-	-	-	V	E	-	D	Y	H	-	D	0.07	0.08	0.07	1667
ブローゾ 839	N	D	-	-	S	L	Q	Y	D	I	P	T	-	V	0.08	0.08	0.07	1668
ブローゾ 840	Y	V	-	R	-	Q	L	-	V	Y	H	Y	-	N	0.15	0.08	0.07	1669
ブローゾ 841	H	D	-	-	-	D	G	-	-	-	I	I	-	S	0.08	0.08	0.07	1670
ブローゾ 842	F	D	-	-	-	-	L	-	-	T	I	I	-	P	0.08	0.08	0.08	1671
ブローゾ 843	-	D	-	-	S	D	R	G	-	N	A	A	-	H	0.07	0.08	0.07	1672
ブローゾ 844	N	I	-	L	A	Q	-	N	-	D	P	T	-	N	0.07	0.08	0.08	1673
ブローゾ 845	T	N	-	-	S	K	S	Q	V	-	D	H	-	I	0.10	0.08	0.09	1674
ブローゾ 846	N	H	-	H	-	Q	-	W	-	L	T	N	-	N	0.09	0.07	0.07	1675
ブローゾ 847	L	L	-	H	-	Q	G	-	L	Y	H	L	-	H	0.09	0.07	0.08	1676
ブローゾ 848	T	N	-	D	S	K	L	E	G	D	D	N	-	F	0.09	0.07	0.07	1677
ブローゾ 849	N	D	-	-	-	-	M	-	-	-	L	L	-	D	0.08	0.07	0.07	1678
ブローゾ 850	F	H	-	-	-	-	V	-	-	-	I	N	-	N	0.07	0.07	0.07	1679
ブローゾ 851	D	F	-	-	-	D	G	-	-	T	Y	V	-	S	0.07	0.07	0.08	1680

【 0 7 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 3 4 - 2 2】

ファージ:852	-	S	-	-	-	Q	-	-	-	N	N	T	-	N	0.07	0.07	0.08	1681
ファージ:853	-	-	-	H	L	-	S	E	Q	F	D	I	-	I	0.08	0.07	0.08	1682
ファージ:854	D	D	-	-	-	-	W	E	F	V	F	F	-	D	0.08	0.07	0.08	1683
ファージ:855	Y	N	-	E	Q	Q	Q	-	-	D	P	S	-	I	0.07	0.07	0.07	1684
ファージ:856	N	T	-	-	T	-	Q	H	-	F	N	-	-	L	0.08	0.07	0.08	1685
ファージ:857	H	P	-	Q	-	G	-	E	-	V	D	Y	-	V	0.08	0.07	0.08	1686
ファージ:858	-	A	-	S	R	Q	L	G	-	D	A	Y	-	N	0.07	0.07	0.07	1687
ファージ:859	D	I	-	-	A	Q	E	V	H	V	Y	T	-	P	0.07	0.07	0.07	1688
ファージ:860	F	F	-	E	G	N	L	-	A	Y	L	L	-	L	0.08	0.07	0.08	1689
ファージ:861	Y	-	-	-	-	D	G	E	-	N	I	V	-	D	0.07	0.07	0.07	1690

【 0 7 6 0】

10

20

30

40

50

【表 3 5】

表 3 2。合成のために選択されるペプチドの配列(CD3 scFv ペプチドー B 最適化)

ファージ-ID	配列	配列番号
ファージ-AA	DDCWPDWEFDFACA	824
ファージ-AB	YICGLDFPDFLYCD	825
ファージ-AC	FDCWPDWEEYFVCD	826
ファージ-AD	YICWPDWEEYFDCD	827
ファージ-AE	NICWPDWEDDYFCF	828
ファージ-AF	NFCWPDWEYIYPCI	829
ファージ-AG	VDCWPDWEEEDFLCI	830
ファージ-AH	HACWPDWEEYFPCN	831
ファージ-AI	YDCGPDVDESYVCV	832
ファージ-AJ	IDCWPDWEDDTFCY	833
ファージ-AK	YLCGPDGDETLACY	834
ファージ-AL	VDCGPDGDESILCY	835

【0761】

本開示の好ましい実施形態が本明細書中で示され、記載されてきたが、このような実施形態はほんの一例として提供されているに過ぎないということは、当業者に明らかであろう。多くの変形、変更、および置き換えは、本開示から逸脱することなく、当業者によって想到されるものである。本明細書に記載される本開示の実施形態の様々な代案が、本開示の実施に際して利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を定義するものであり、ならびに、この特許請求の範囲およびその同等物の範囲内の方法および構造はそれによって包含されることが意図されている。

10

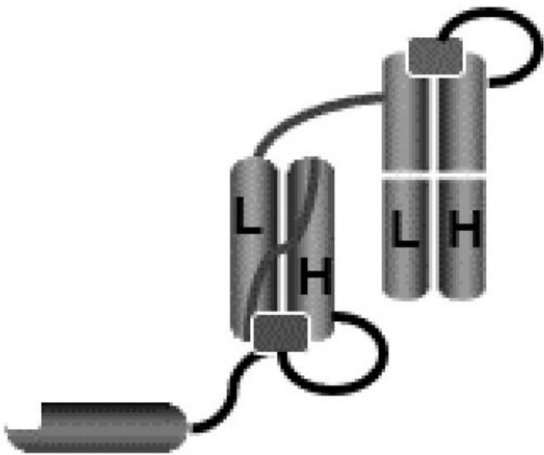
20

30

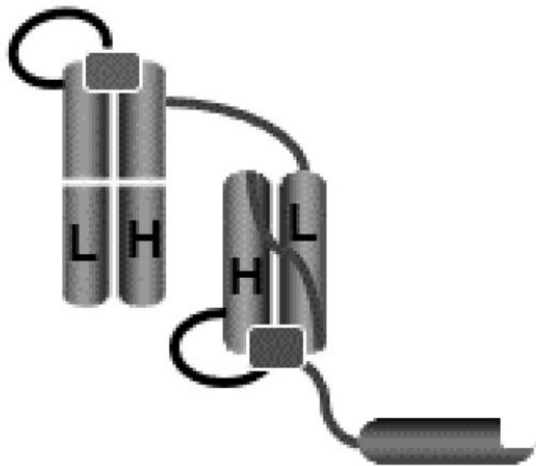
40

50

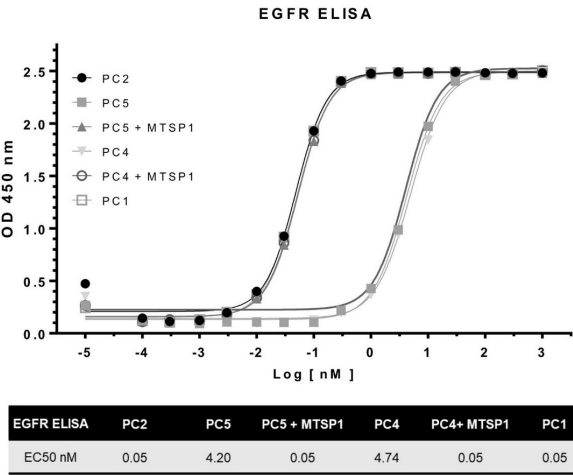
【図面】
【図 1 A】



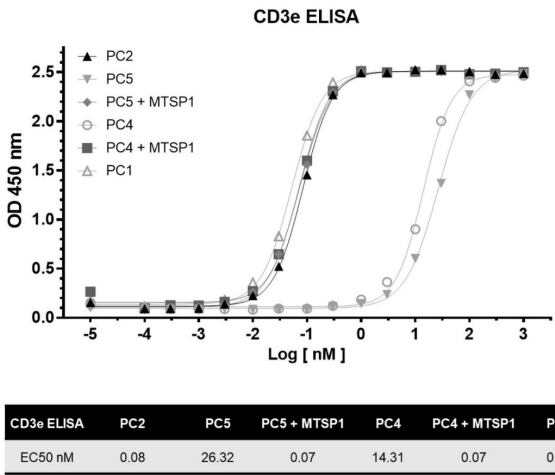
【図 1 B】



【図 2】



【図 3】



10

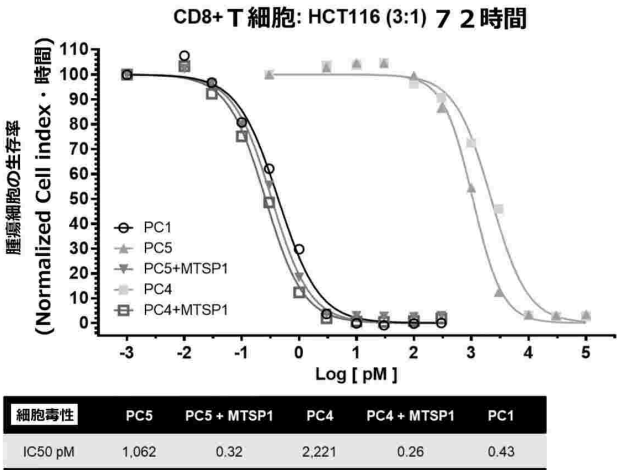
20

30

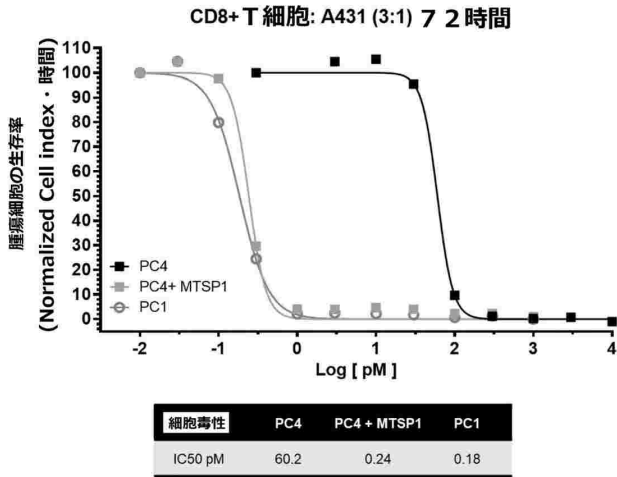
40

50

【 図 4 】

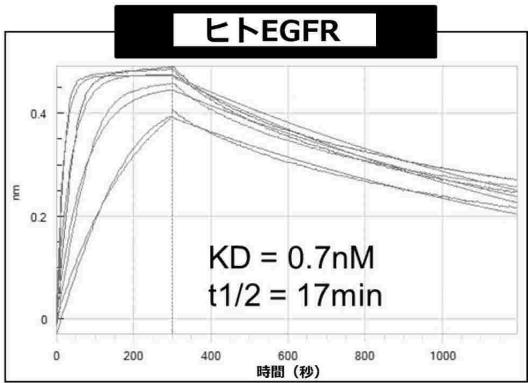


【 図 5 】

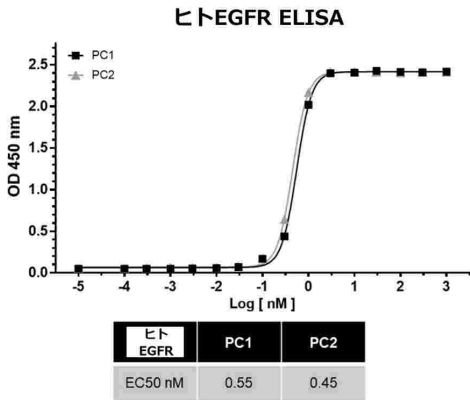


10

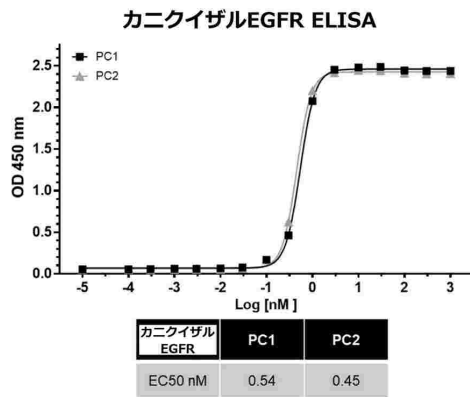
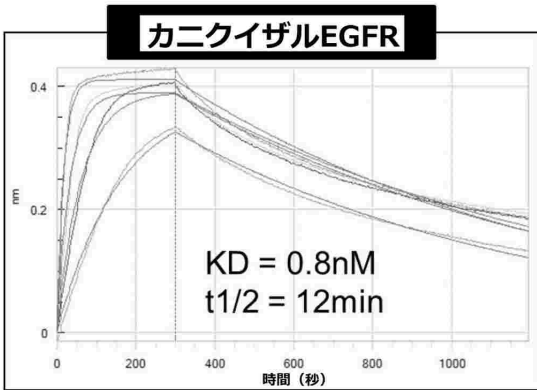
【 図 6 】



【 図 7 】



20

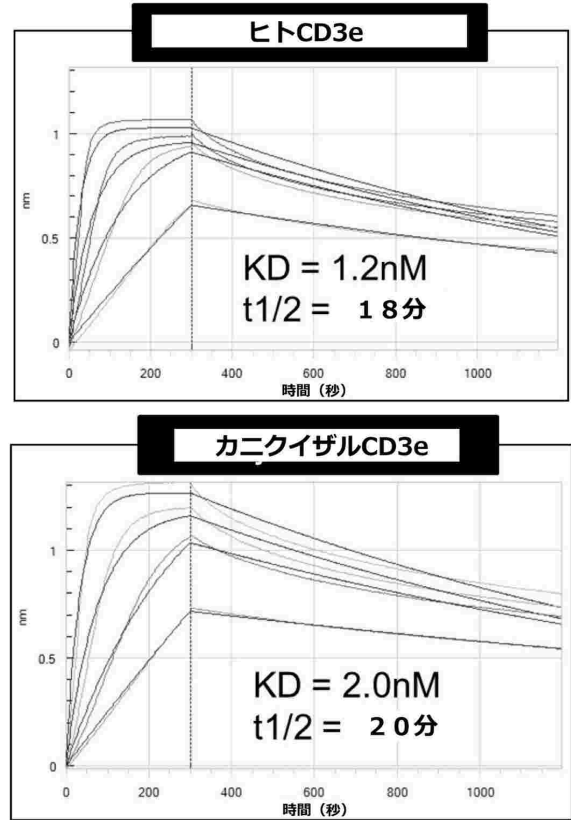


30

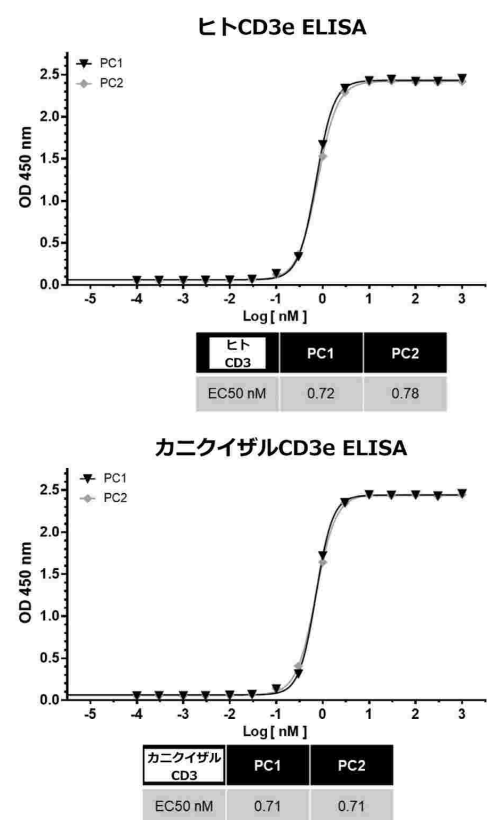
40

50

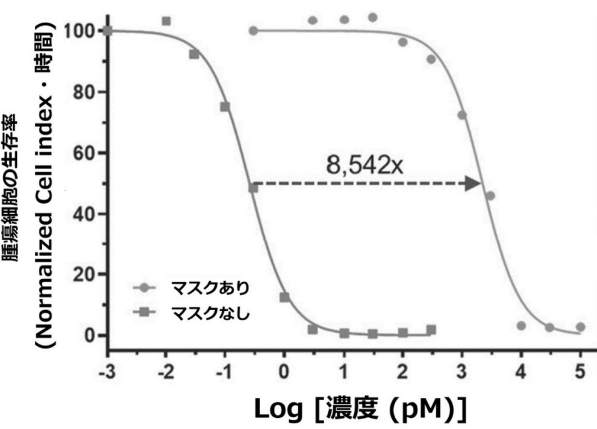
【 図 8 】



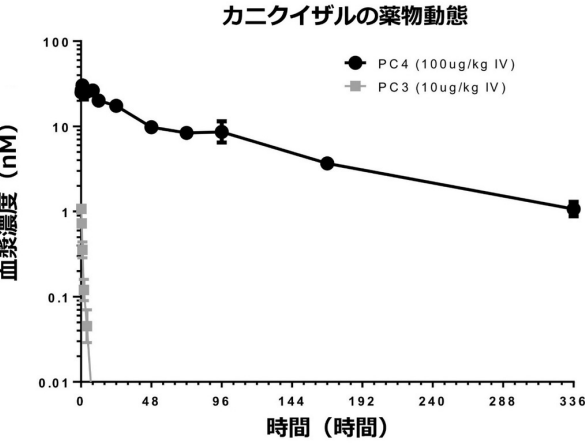
【 図 9 】



【 図 1 0 A 】



【 図 1 0 B 】



10

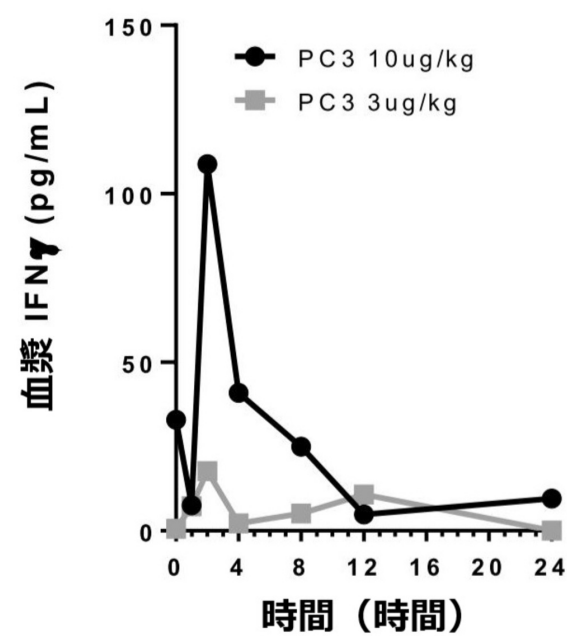
20

30

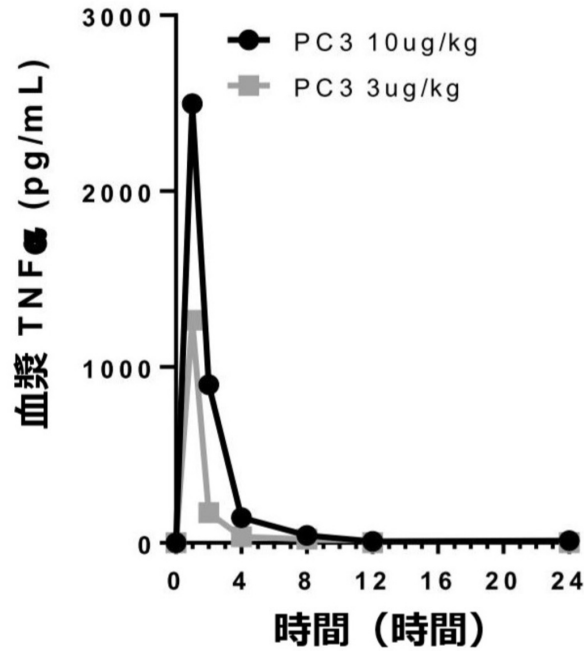
40

50

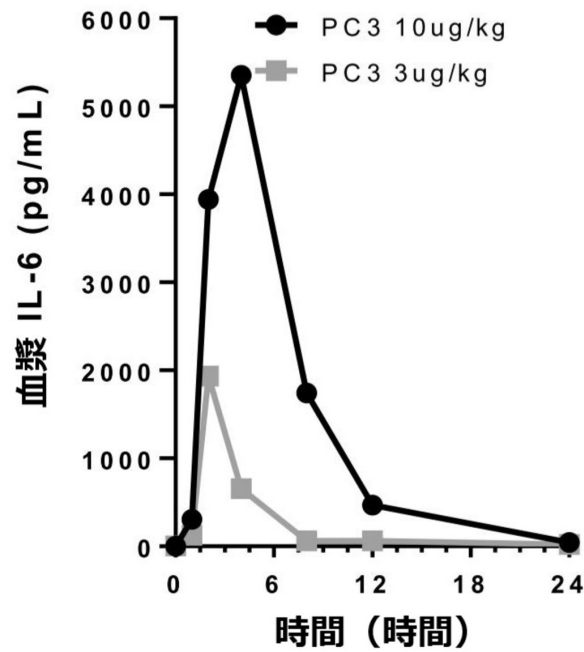
【図 1 1 A】



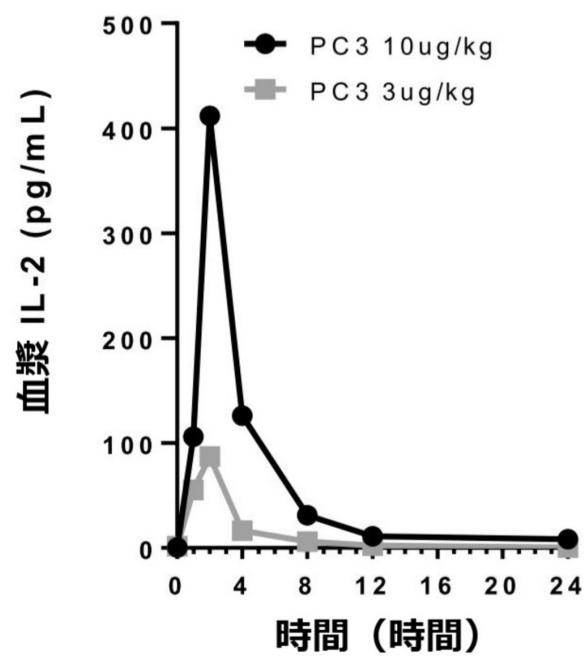
【図 1 1 B】



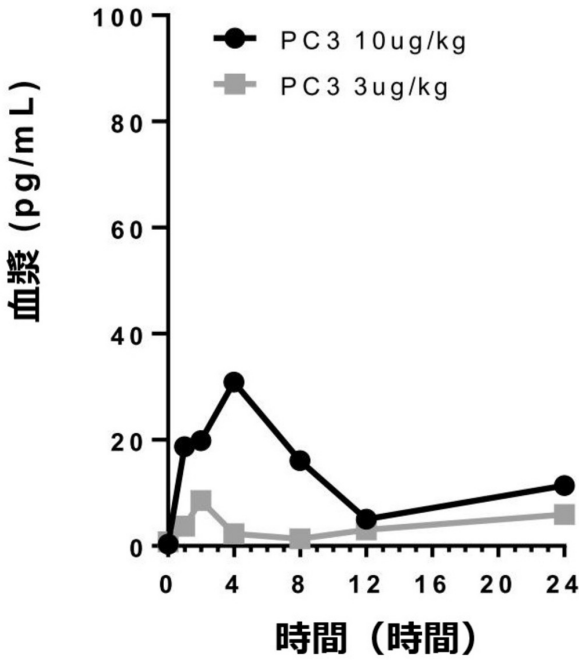
【図 1 1 C】



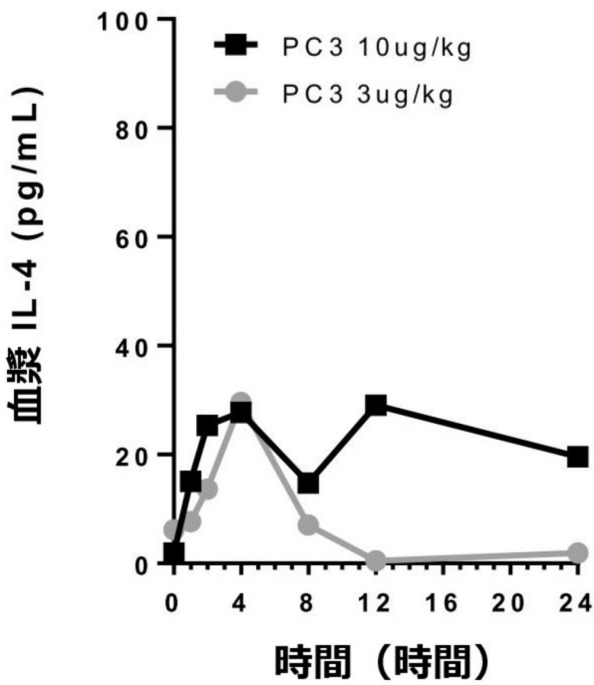
【図 1 1 D】



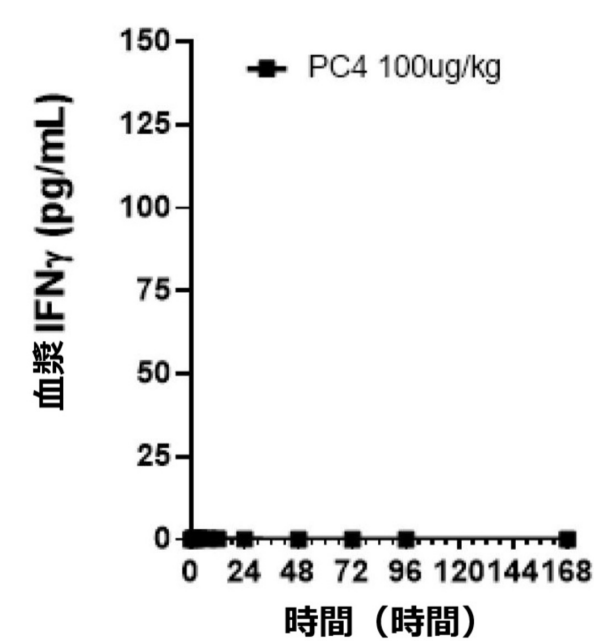
【図 1 1 E】



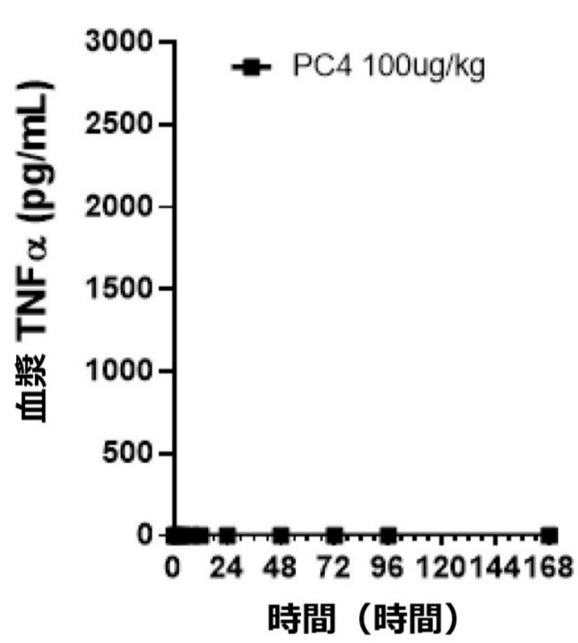
【図 1 1 F】



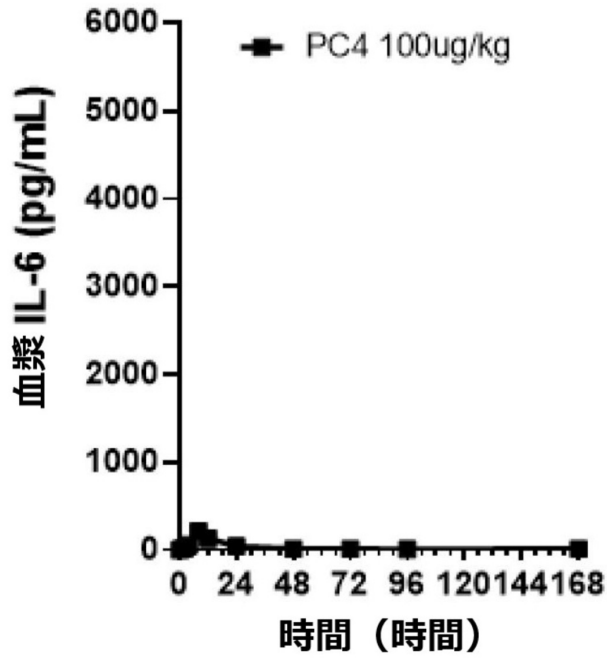
【図 1 1 G】



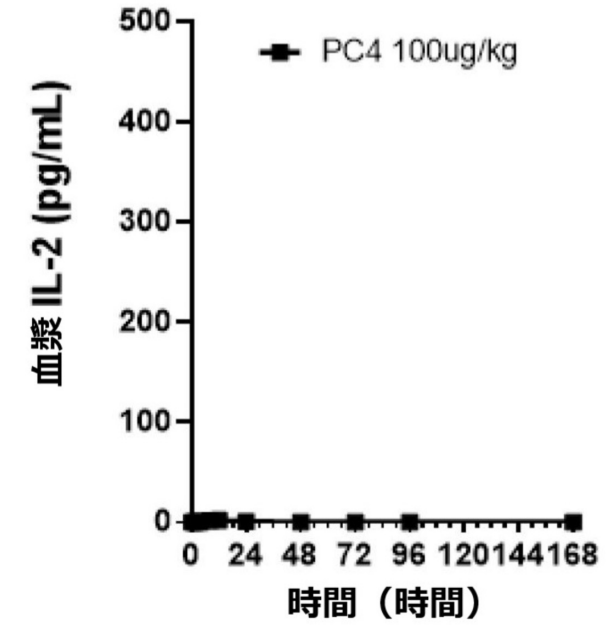
【図 1 1 H】



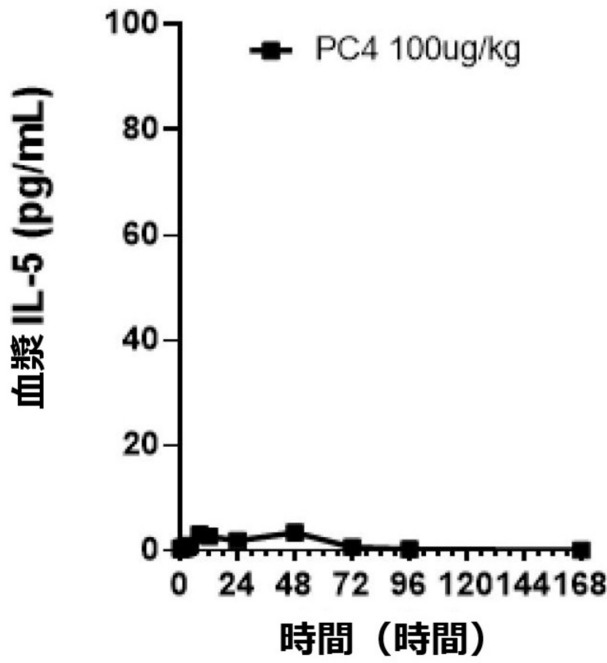
【図 1 1 I】



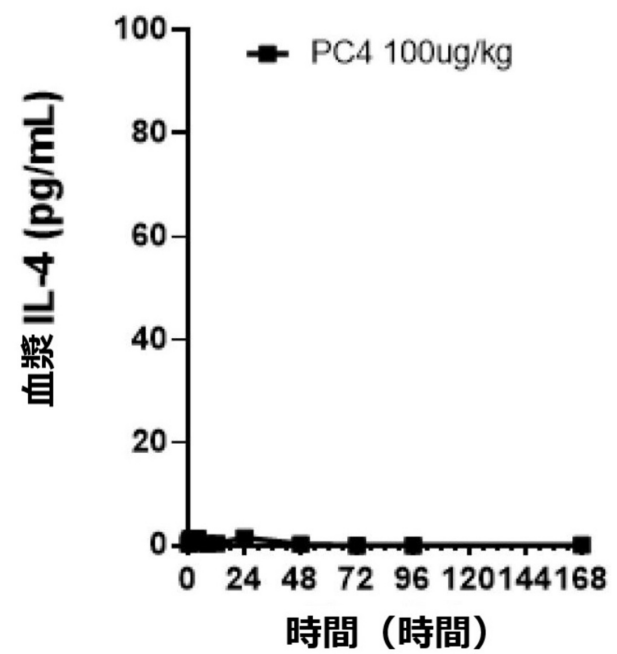
【図 1 1 J】



【図 1 1 K】



【図 1 1 L】



10

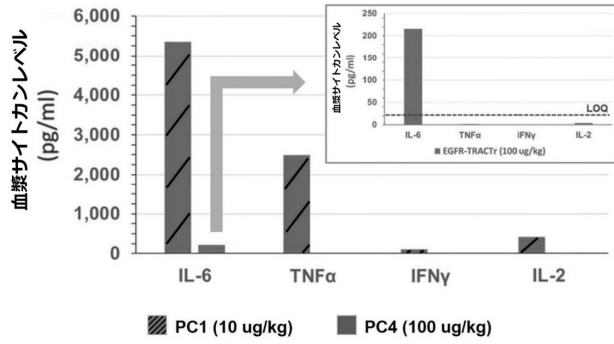
20

30

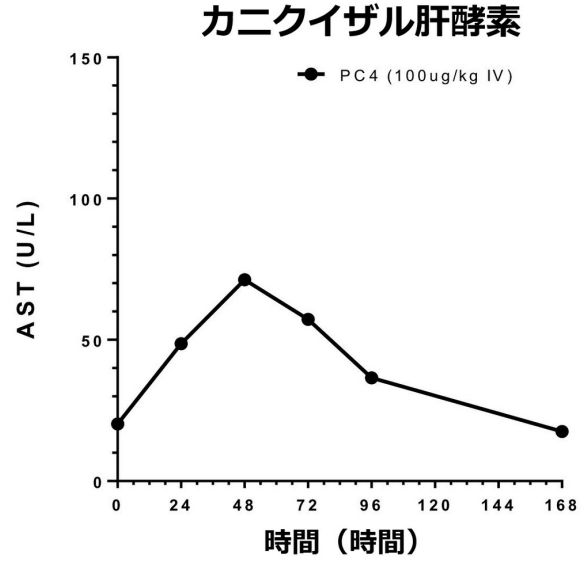
40

50

【図 1 2】

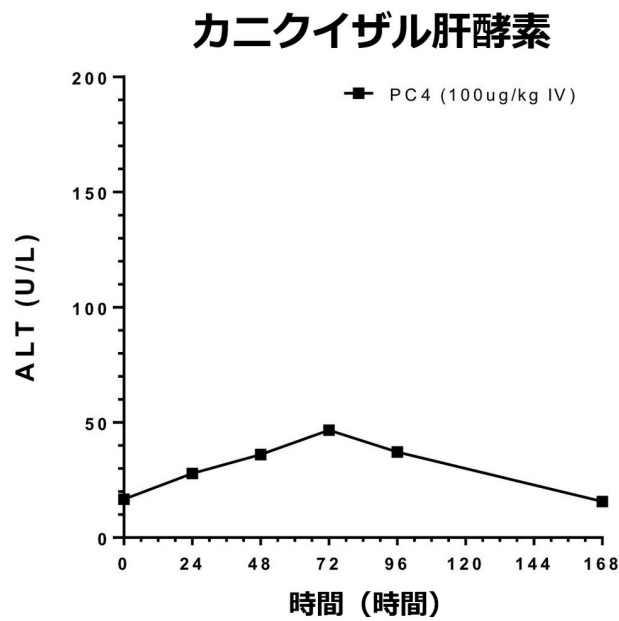


【図 1 3 A】

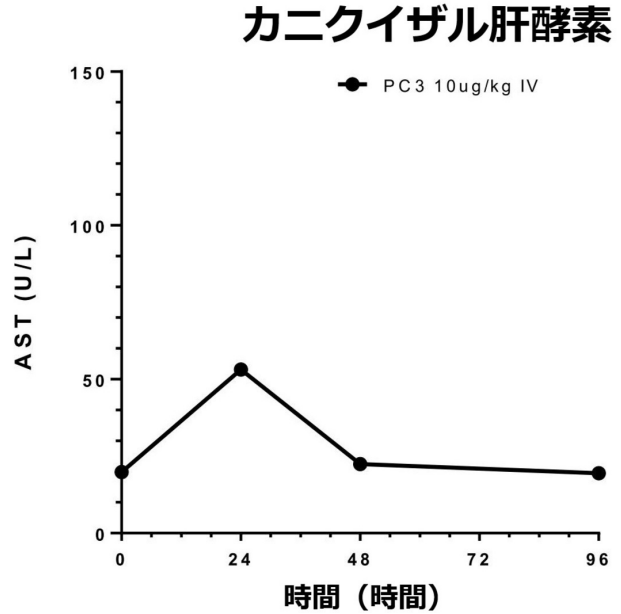


10

【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



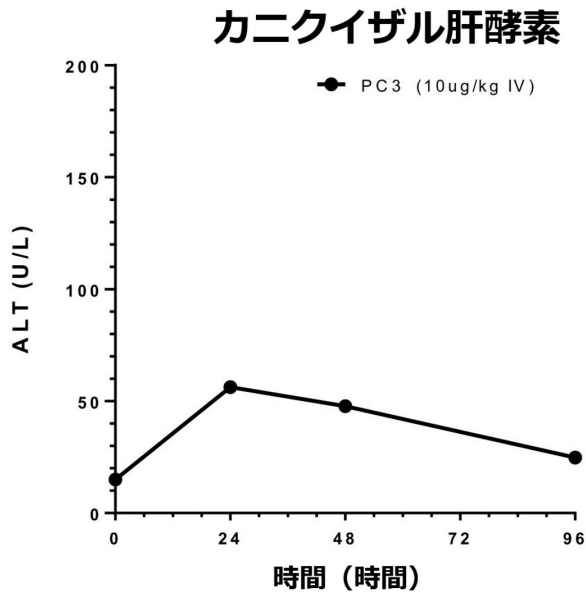
20

30

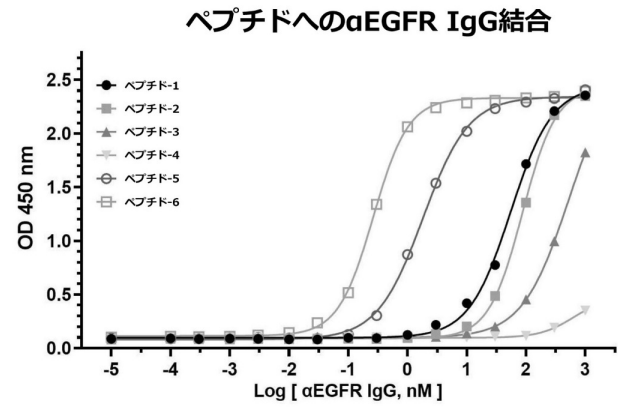
40

50

【図 13 D】

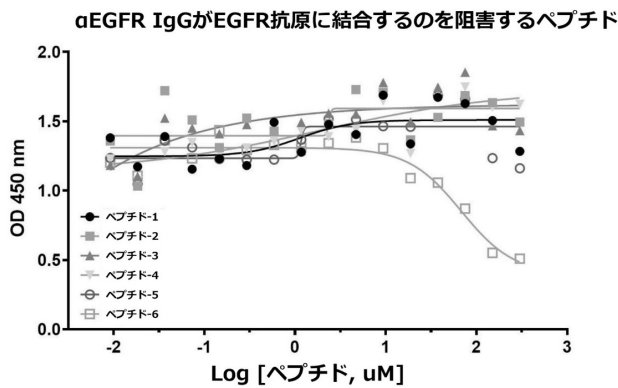


【図 14】

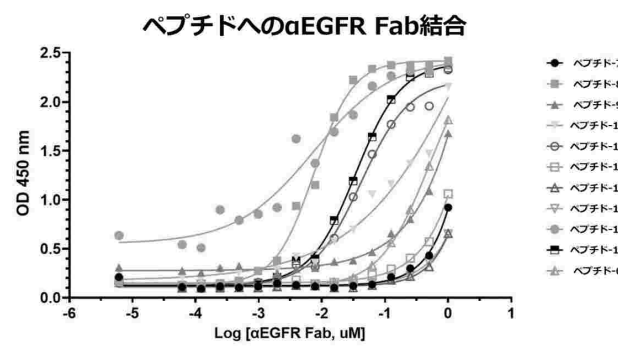


10

【図 15】



【図 16】



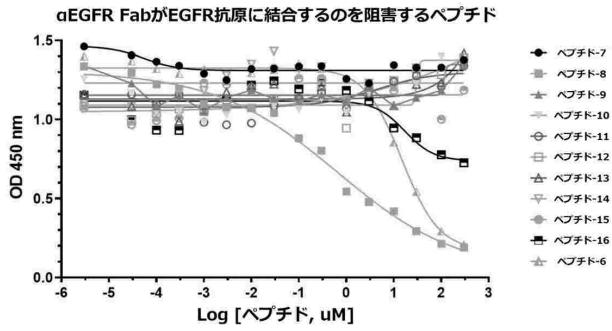
20

30

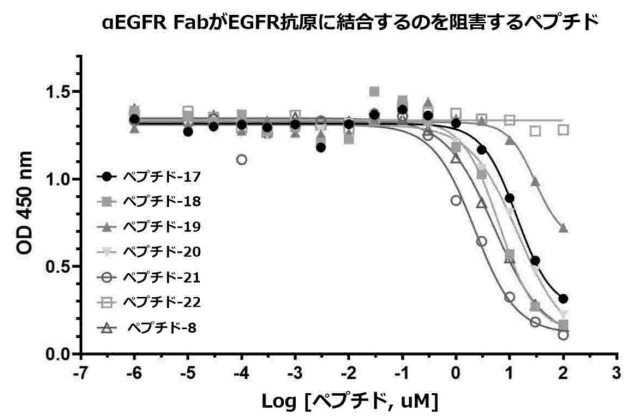
40

50

【図 17】

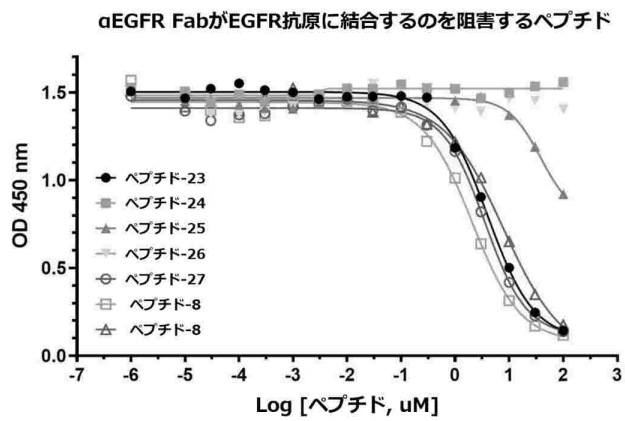


【図 18】

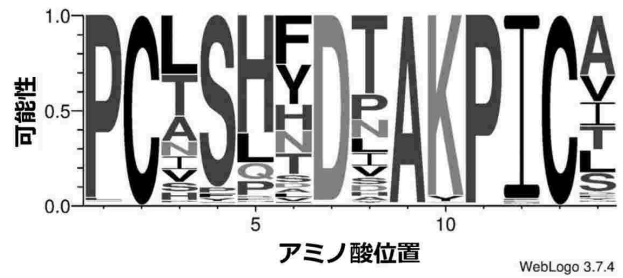


10

【図 19】



【図 20】



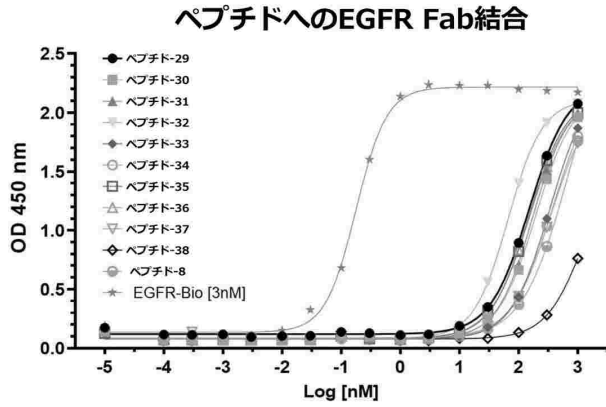
20

30

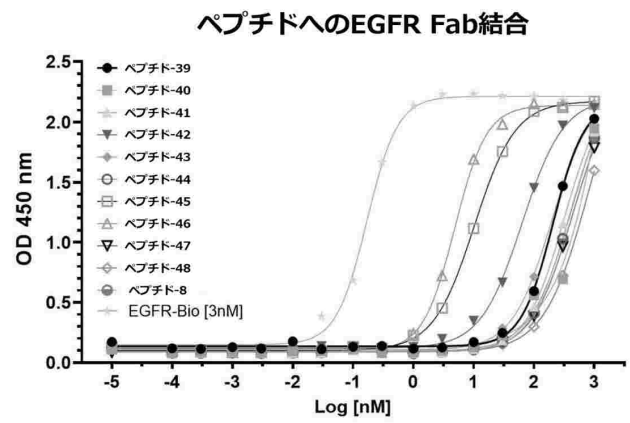
40

50

【図 2 1】

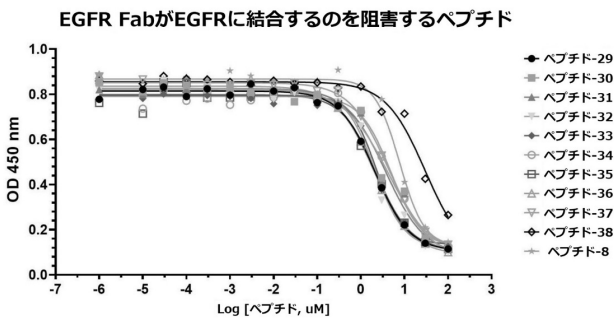


【図 2 2】

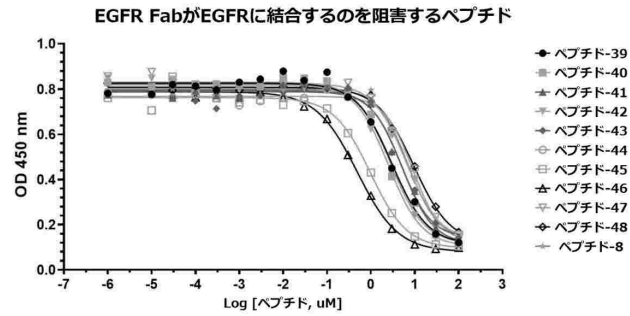


10

【図 2 3】

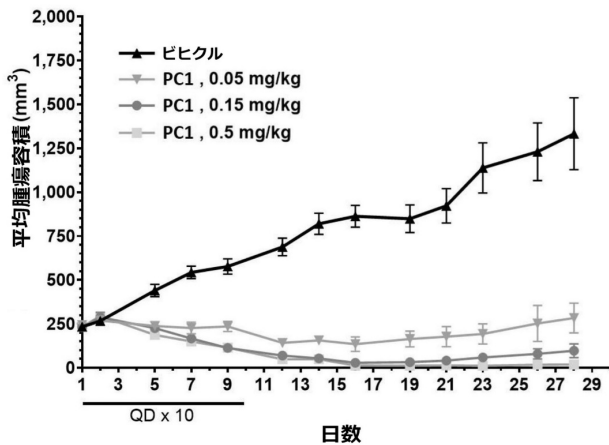


【図 2 4】

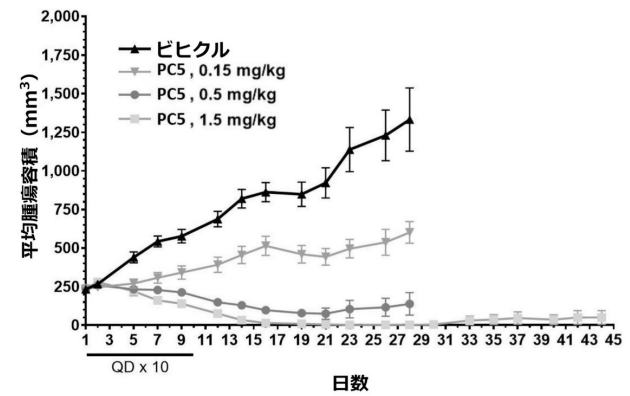


20

【図 2 5】



【図 2 6】

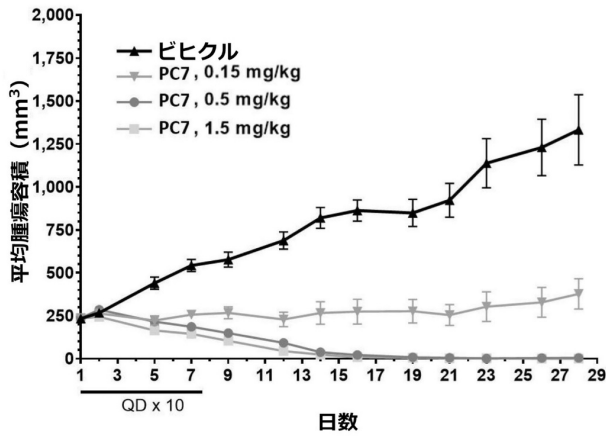


30

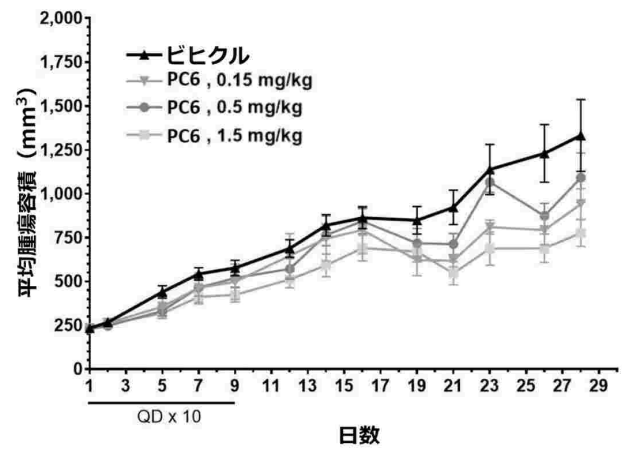
40

50

【図 27】

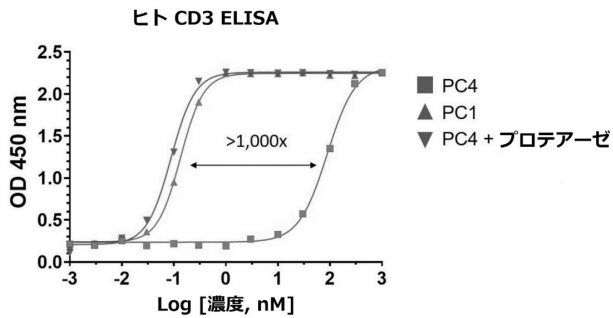


【図 28】

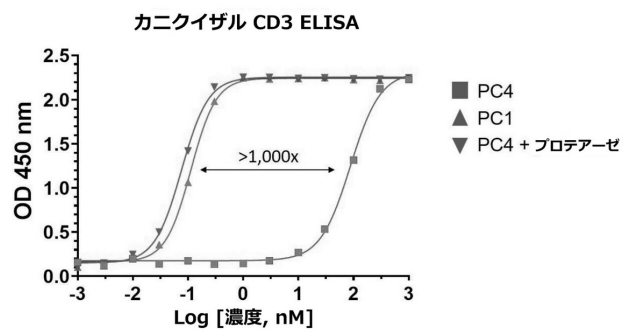


10

【図 29】

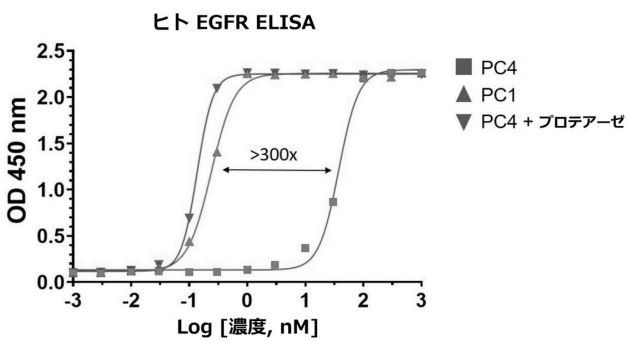


【図 30】

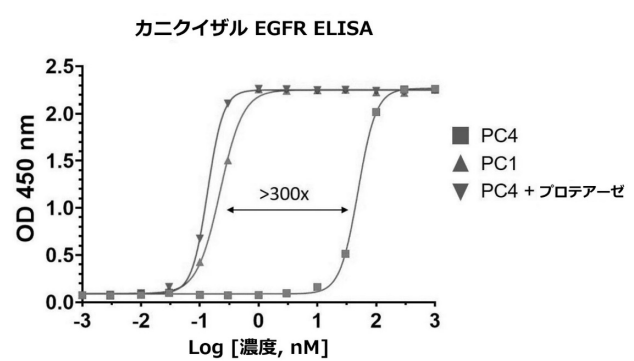


20

【図 31】



【図 32】

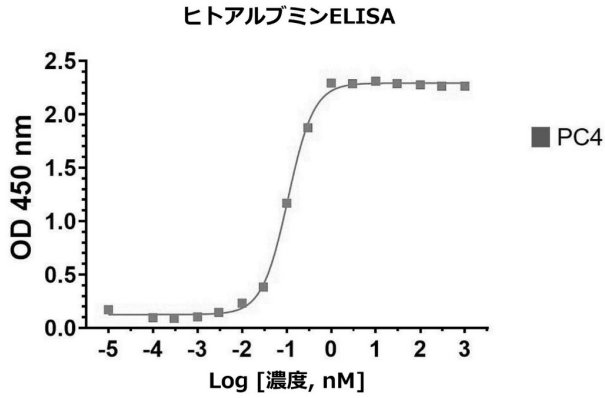


30

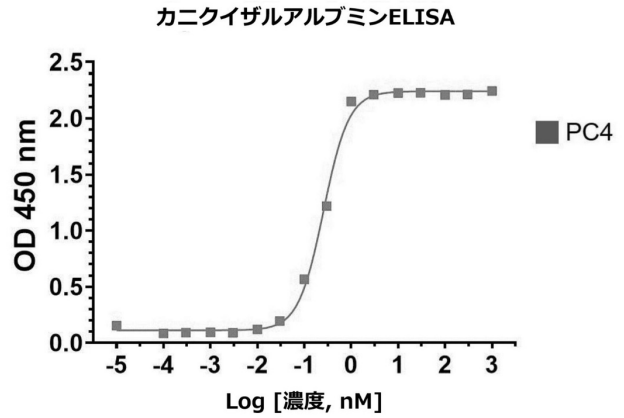
40

50

【図 3 3】

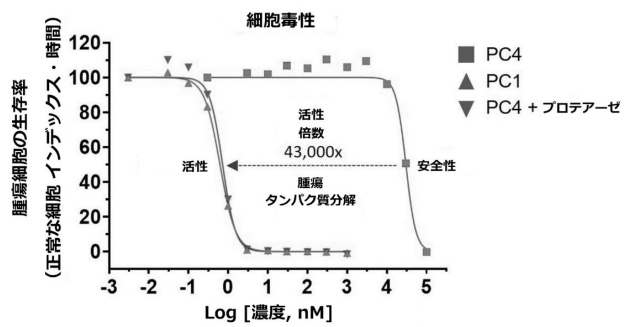


【図 3 4】

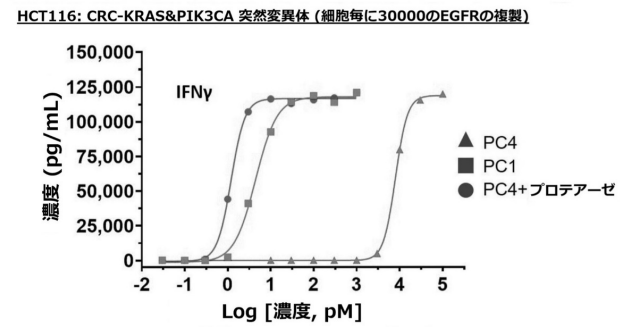


10

【図 3 5】

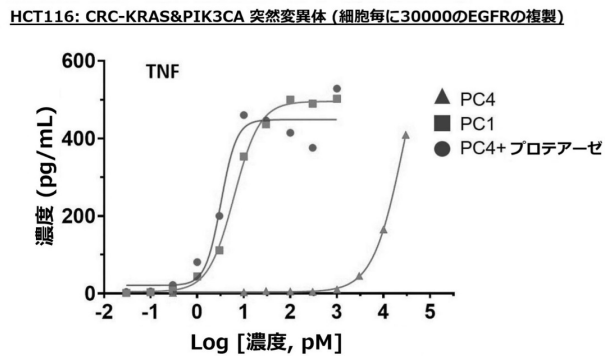


【図 3 6】

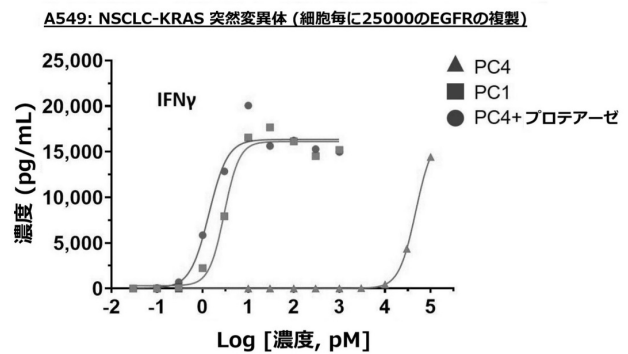


20

【図 3 7】



【図 3 8】



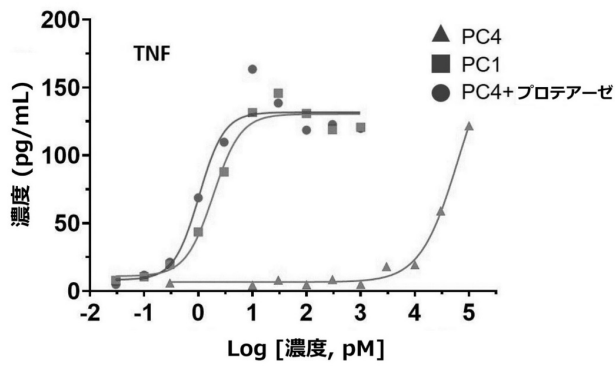
30

40

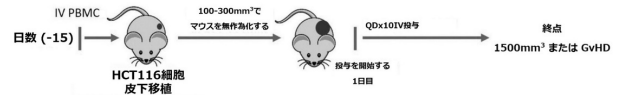
50

【図 3 9】

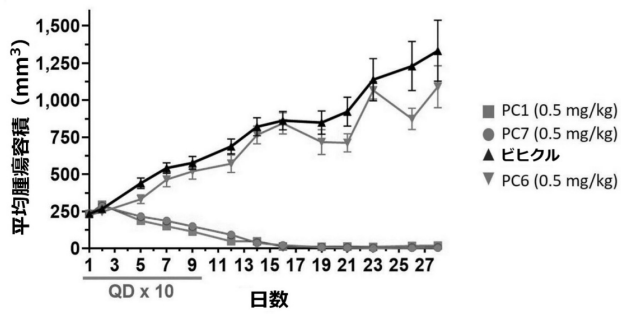
A549: NSCLC-KRAS 突然変異体 (細胞毎に25000のEGFRの複製)



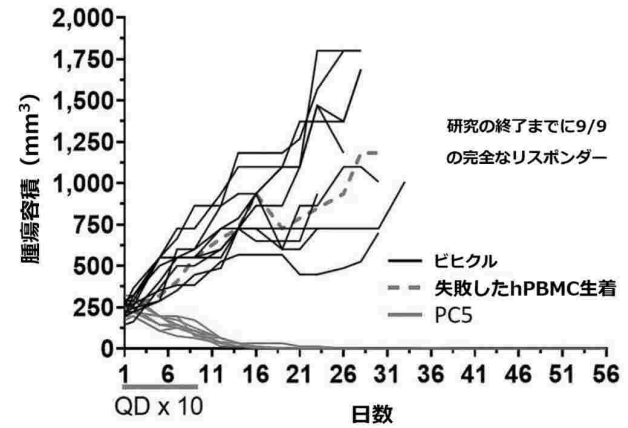
【図 4 0】



【図 4 1】



【図 4 2】



10

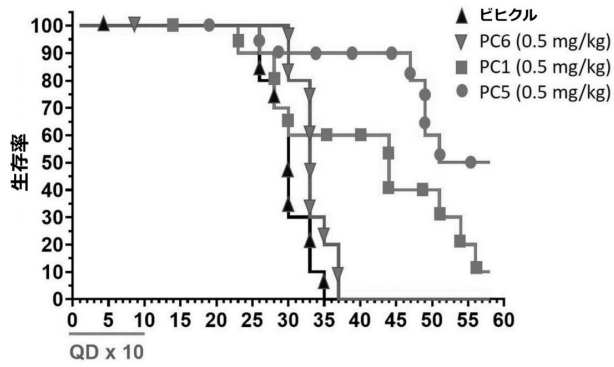
20

30

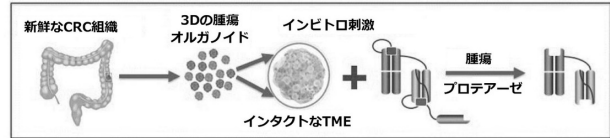
40

50

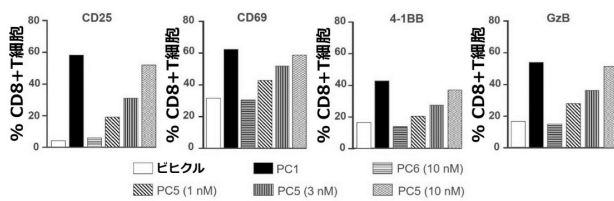
【図 4 3】



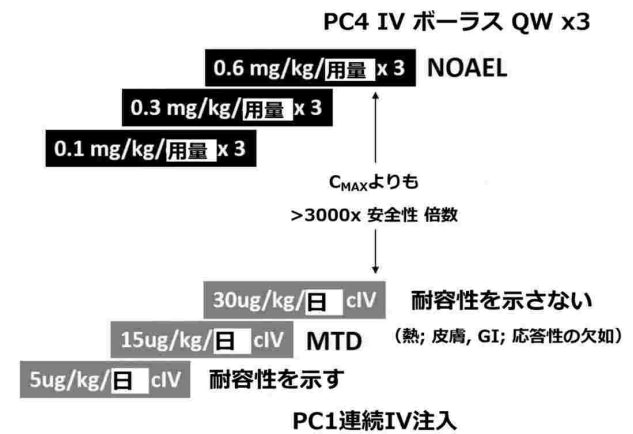
【図 4 4】



【図 4 5】



【図 4 6】



10

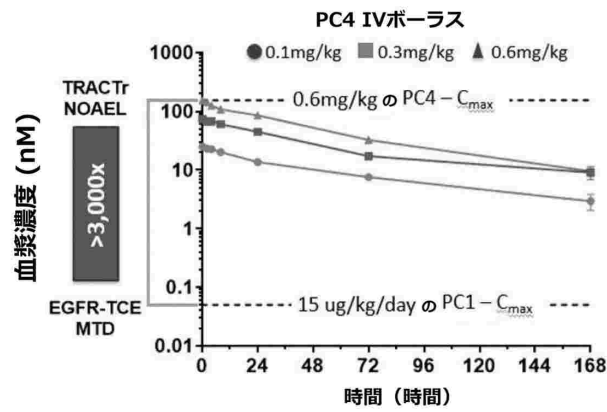
20

30

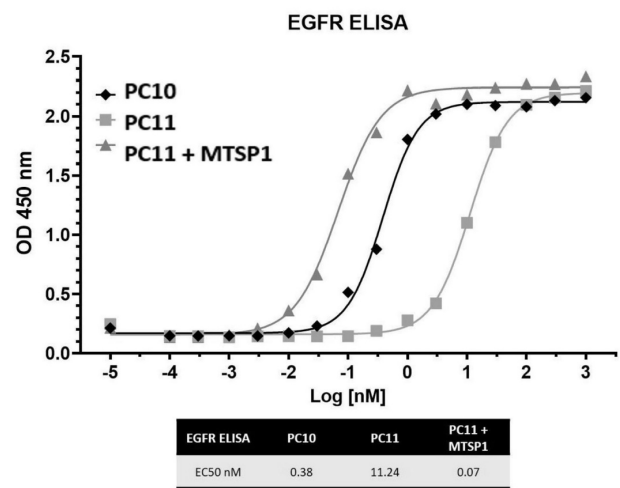
40

50

【 図 4 7 】

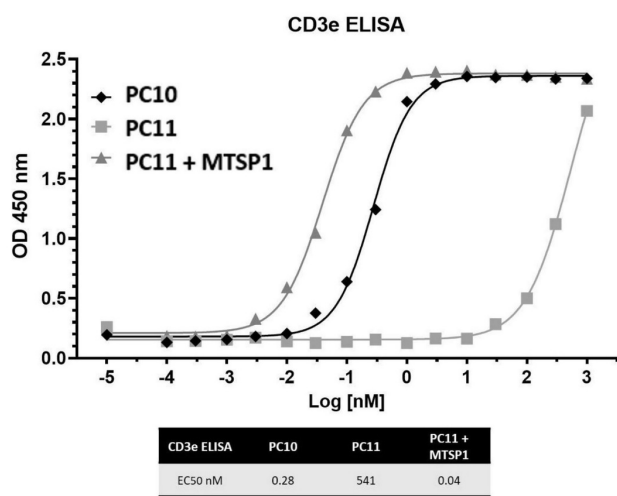


【 図 4 8 】

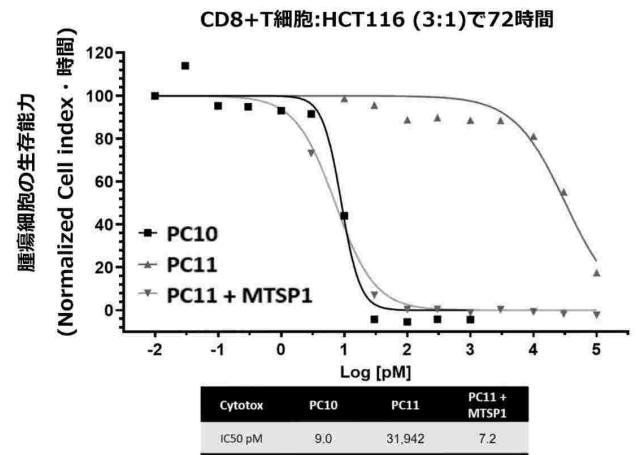


10

【 図 4 9 】



【 図 5 0 】



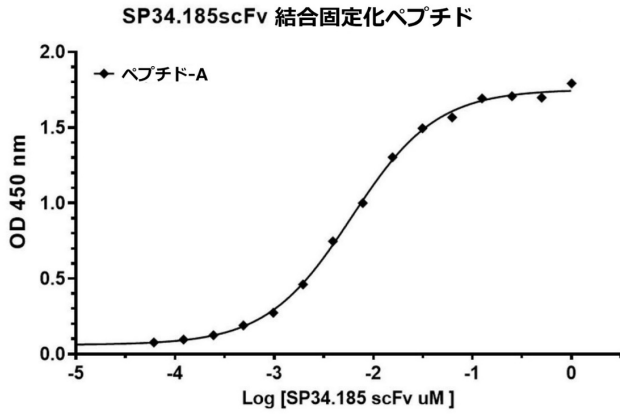
20

30

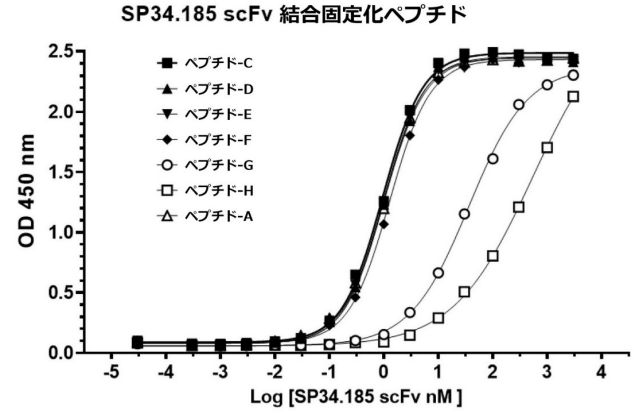
40

50

【図 5 1 A】

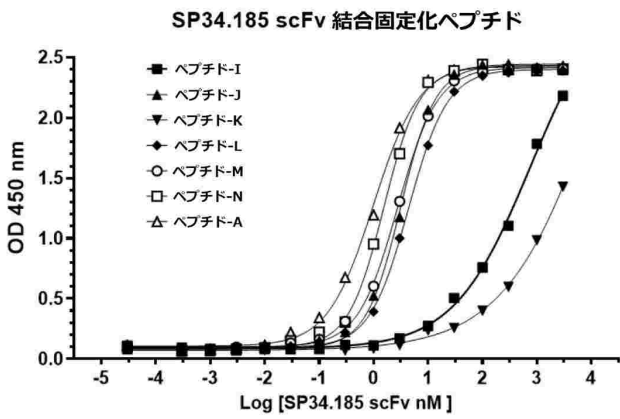


【図 5 1 B】

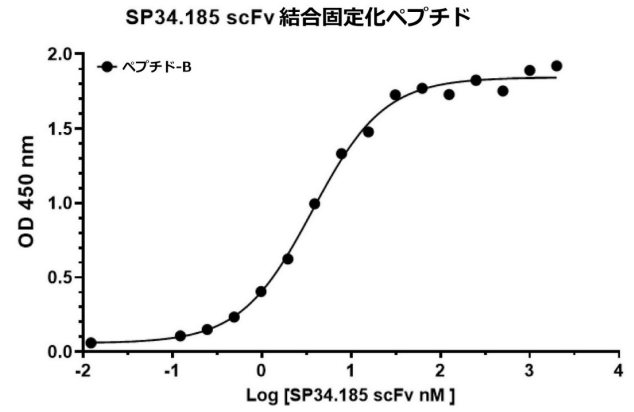


10

【図 5 1 C】



【図 5 1 D】



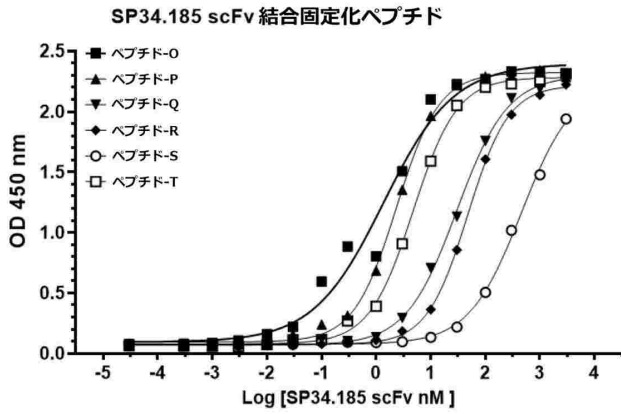
20

30

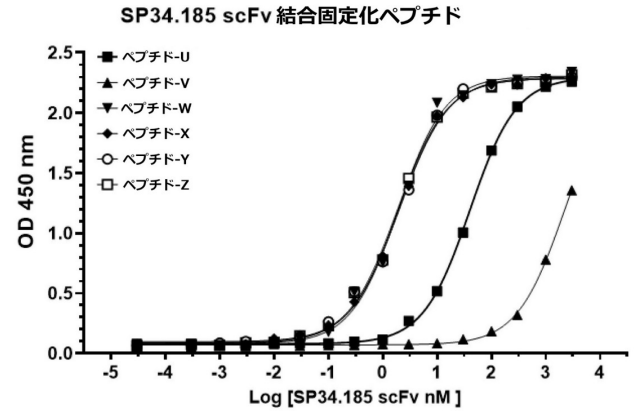
40

50

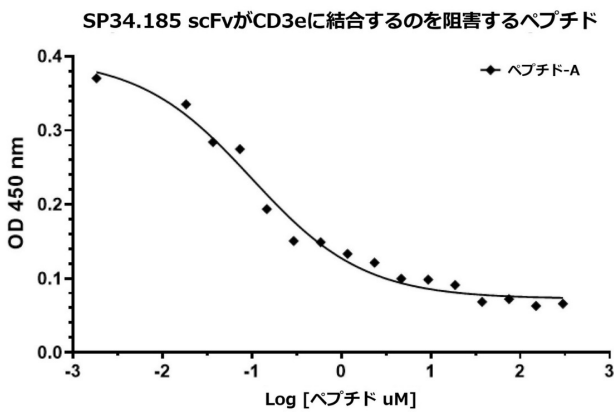
【図 5 1 E】



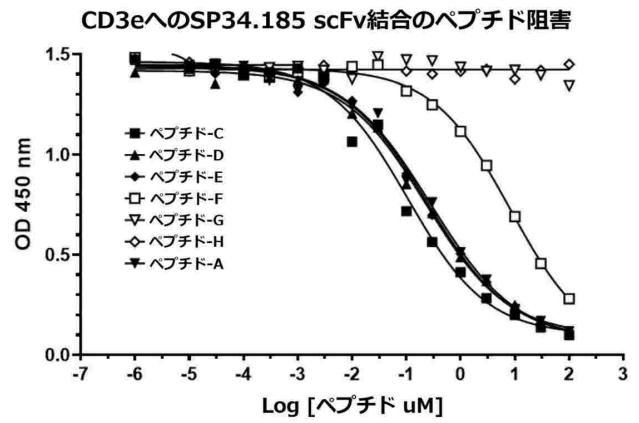
【図 5 1 F】



【図 5 2 A】



【図 5 2 B】



10

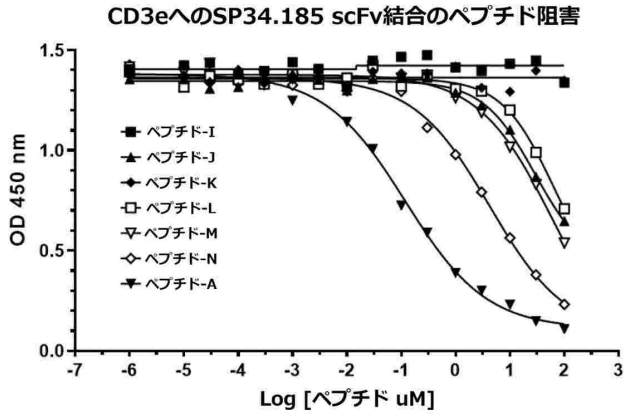
20

30

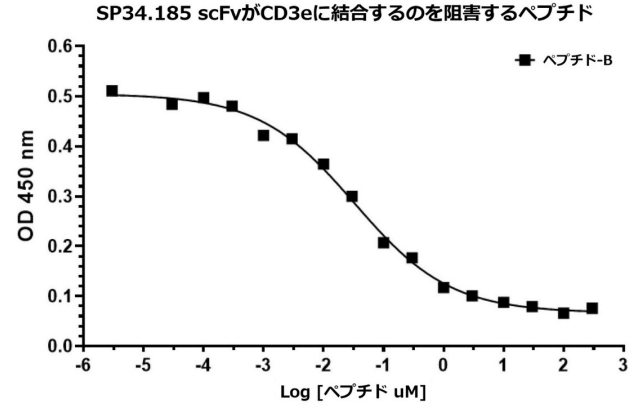
40

50

【図 5 2 C】

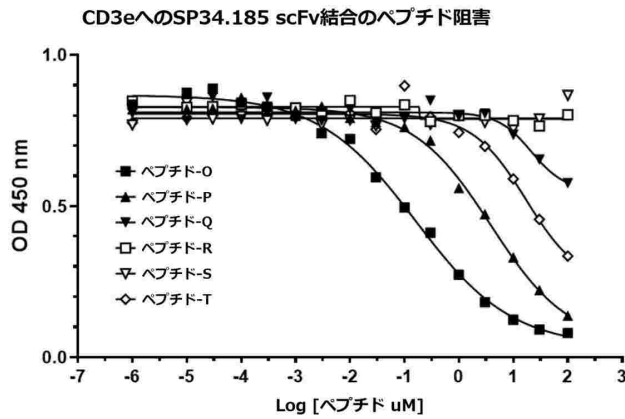


【図 5 2 D】

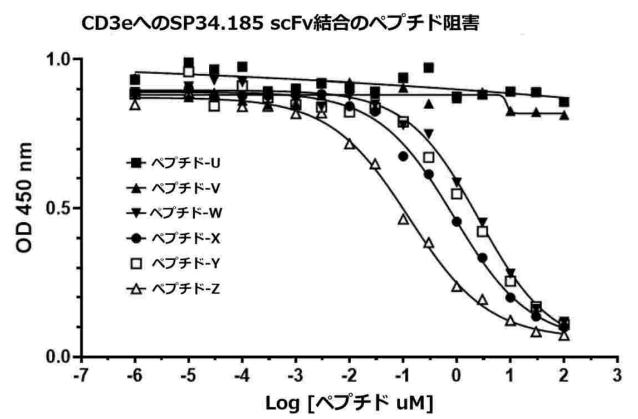


10

【図 5 2 E】



【図 5 2 F】



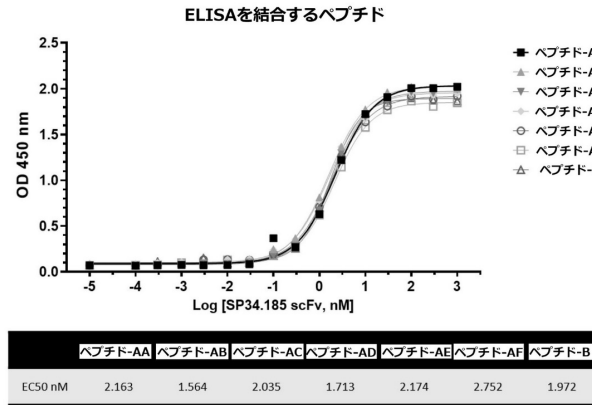
20

30

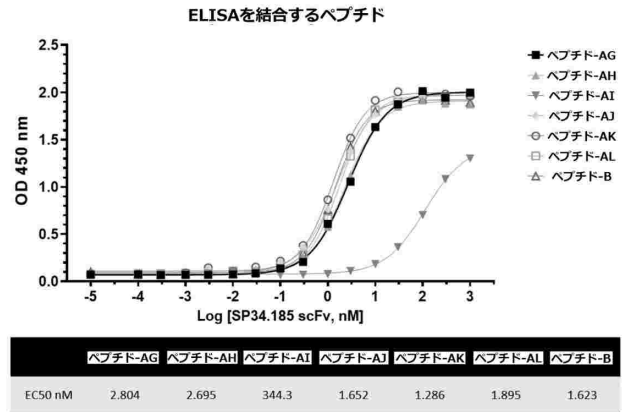
40

50

【図 5 3 A】

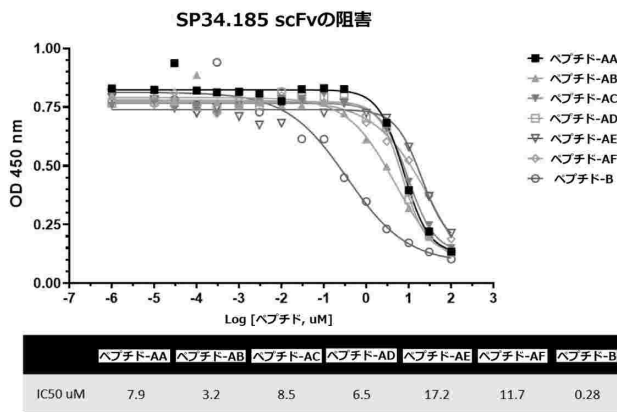


【図 5 3 B】

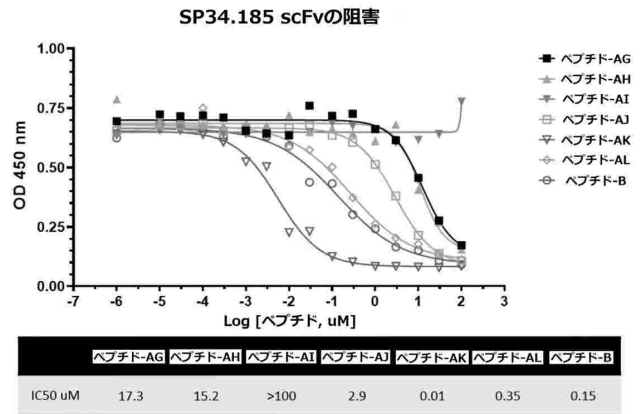


10

【図 5 4 A】

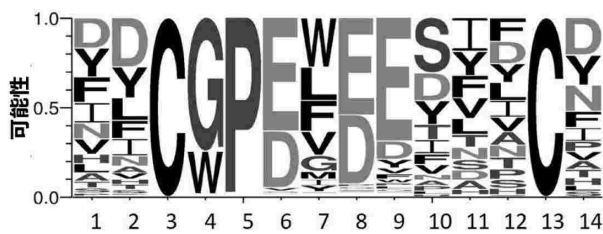


【図 5 4 B】



20

【図 5 5】



30

【配列表】

2024518539000001.app

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/27688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C07K 16/28; C07K 16/32 (2022.01)

ADD. A61K 38/03; A61K 47/68; A61P 35/04 (2022.01)

CPC - INV. C07K 16/2809; C07K 16/28; C07K 16/2863; C07K 16/32

ADD. A61K 38/03; A61K 47/68; A61K 2039/505; A61P 35/04; C07K 2317/55; C07K 2317/622; C07K 2319/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/247871 A2 (JANUX THERAPEUTICS, INC.) 10 December 2020; paragraphs: [0005], [0067], [0070], [0080], [0081], [0083], [0084], [0100], [0101]	1-22, 29-34, 41-48
—		23-25, 35-37, 39
Y	US 2020/0354452 A1 (CITY OF HOPE) 12 November 2020; paragraph [0198]	23-25, 35-36
Y	US 2016/0193332 A1 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.) 07 July 2016; paragraph: [0007], [0027], [0034]	37
Y	US 2018/0333507 A1 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.) 22 November 2018; paragraph: [0008], [0044]	39

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 September 2022 (27.09.2022)

Date of mailing of the international search report

OCT 13 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/27688

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/27688

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-177, and A2-A1-L1-P1-H1 (isolated polypeptide or polypeptide complex type), muromonab-CD3 or OKT3 (A1 CDRs), SEQ ID NOs: 1, 2, 3 (A1 LC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, respectively), SEQ ID NOs: 4, 5, 6 (A1 HC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, respectively), SEQ ID NO: 13 (A1 scFv amino acid sequence), SEQ ID NO: 21 (A2 Fab light chain amino acid sequence), SEQ ID NO: 23 (A2 Fab heavy chain amino acid sequence).

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/27688

-***Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-177, and A2-A1-L1-P1-H1 (isolated polypeptide or polypeptide complex type), muromonab-CD3 or OKT3 (A1 CDRs), SEQ ID NOs: 1, 2, 3 (A1 LC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, respectively), SEQ ID NOs: 4, 5, 6 (A1 HC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, respectively), SEQ ID NO: 13 (A1 scFv amino acid sequence), SEQ ID NO: 21 (A2 Fab light chain amino acid sequence), SEQ ID NO: 23 (A2 Fab heavy chain amino acid sequence) are directed towards an isolated polypeptide or polypeptide complex.

The isolated polypeptide or polypeptide complex of Claims 1-16, 17 (in-part), 18-25, 29-37, 39, 41-48 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass A2-A1-L1-P1-H1 (first exemplary isolated polypeptide or polypeptide complex type), muromonab-CD3 or OKT3 (first exemplary A1 CDRs), SEQ ID NOs: 1, 2, 3 (first exemplary A1 LC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, respectively), SEQ ID NOs: 4, 5, 6 (first exemplary A1 HC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, respectively), SEQ ID NO: 13 (first exemplary A1 scFv amino acid sequence), SEQ ID NO: 21 (first exemplary A2 Fab light chain amino acid sequence), SEQ ID NO: 23 (first exemplary A2 Fab heavy chain amino acid sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genus found in claims 1, 17, 23-25, 37, and 39 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional isolated polypeptide or polypeptide complex type(s), A1 CDRs, A1 LC-CDR1, 2, 3 and HC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, A1 scFv amino acid sequence(s), A2 Fab light chain and heavy chain amino acid sequences to be searched. Additional isolated polypeptide or polypeptide complex type(s), A1 CDRs, A1 LC-CDR1, 2, 3 and HC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, A1 scFv amino acid sequence(s), A2 Fab light chain and heavy chain amino acid sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected isolated polypeptide or polypeptide complex type(s), A1 CDRs, A1 LC-CDR1, 2, 3 and HC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, A1 scFv amino acid sequence(s), A2 Fab light chain and heavy chain amino acid sequences. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. Exemplary elections would be P2-L2-A2-A1-L1-P1-H1 (isolated polypeptide or polypeptide complex type), orelizumab or TRX4 (A1 CDRs), SEQ ID NOs: 7, 8, 9 (A1 LC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, respectively), SEQ ID NOs: 10, 11, 12 (A1 HC-CDR1, 2, 3 amino acid sequences, respectively), SEQ ID NO: 14 (A1 scFv amino acid sequence), SEQ ID NO: 22 (A2 Fab light chain amino acid sequence), SEQ ID NO: 24 (A2 Fab heavy chain amino acid sequence).

Groups I+ were considered to share the technical features including: an isolated polypeptide or polypeptide complex according to Formula I: A2-A1-L1-P1-H1 wherein: A1 comprises a first antigen recognizing molecule that binds to an effector cell antigen; P1 comprises a peptide that binds to A1; L1 comprises a linking moiety that connects A1 to P1 and is a substrate for a tumor specific protease; H1 comprises a half-life extending molecule; and A2 comprises a second antigen recognizing molecule that binds to epidermal growth factor receptor or EGFR; these shared technical features are previously disclosed by WO 2020/247871 A2 to Janux Therapeutics, Inc. (hereinafter "Janux").

Janux discloses an isolated polypeptide or polypeptide complex according to Formula I: A2-A1-L1-P1-H1 wherein: A1 comprises a first antigen recognizing molecule that binds to an effector cell antigen; P1 comprises a peptide that binds to A1; L1 comprises a linking moiety that connects A1 to P1 and is a substrate for a tumor specific protease; H1 comprises a half-life extending molecule; and A2 comprises a second antigen recognizing molecule that binds to epidermal growth factor receptor or EGFR (polypeptides or polypeptide complexes according to Formula I: A2-A1-L1-P1-H1, wherein: A1 comprises a first antigen recognizing molecule that binds to a first target antigen, such as an effector cell antigen; P1 comprises a peptide that binds to A1; L1 comprises a linking moiety that connects A1 to P1 and is a substrate for a tumor specific protease; H1 comprises a half-life extending molecule; and A2 comprises a second antigen recognizing molecule that binds to a second target antigen, such as EGFR; paragraphs [0067], [0080]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Janux reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)**A 6 1 K****39/395****T****A 6 1 K 47/66 (2017.01)****A 6 1 K****39/395****E****A 6 1 P 35/00 (2006.01)****A 6 1 K****47/66****A 6 1 P 43/00 (2006.01)****A 6 1 P****35/00****A 6 1 P****43/00****1 0 5**

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,
LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,
RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,Z
A,ZM,ZW

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州 サンディエゴ ビスタ・ソレント・パークウェイ
1 0 9 5 5 スイート 2 0 0

F ターム (参考)

4C076 AA95 CC27 EE59

4C085 AA13 AA14 AA37 BB11 BB23 BB41 CC21 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA30 BA32 DA76 EA20 FA74